

ZUR CHEMIE UND WERTBESTIMMUNG DER ENZIANDROGE

Keyvandokht Münzing-Vasirian

1975

ZUR CHEMIE UND WERTBESTIMMUNG DER ENZIANDROGE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München



vorgelegt
von
Keyvandokht Münzing-Vasirian
aus
Teheran

Dezember 1974



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 1. 1975

Herrn Professor Dr. C. v. Siedow habe ich herzlich
das viele dankbare Entgegenkommen für meine
Als dankbare Anerkennung.

Meiner lieben Mutter gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

Herrn Professor Dr. H. Wagner danke ich herzlich für
das stets gezeigte Interesse an dieser Arbeit und
die vielseitige Unterstützung.

1.1. Einleitung	1
1.2. Zusammenfassung	1
1.3. Zielsetzung und Zweckmäßigkeit der Arbeit	1
1.4. Aufbau der Arbeit	1
1.5. Abkürzungen	1
1.6. Literaturverzeichnis	1
1.7. Zusammenfassung	1
1.8. Zusammenfassung	1
1.9. Zusammenfassung	1
2.1. Einleitung	2
2.2. Zusammenfassung	2
2.3. Zielsetzung und Zweckmäßigkeit der Arbeit	2
2.4. Aufbau der Arbeit	2
2.5. Abkürzungen	2
2.6. Literaturverzeichnis	2
2.7. Zusammenfassung	2
2.8. Zusammenfassung	2
2.9. Zusammenfassung	2
3.1. Einleitung	3
3.2. Zusammenfassung	3
3.3. Zielsetzung und Zweckmäßigkeit der Arbeit	3
3.4. Aufbau der Arbeit	3
3.5. Abkürzungen	3
3.6. Literaturverzeichnis	3
3.7. Zusammenfassung	3
3.8. Zusammenfassung	3
3.9. Zusammenfassung	3
4.1. Einleitung	4
4.2. Zusammenfassung	4
4.3. Zielsetzung und Zweckmäßigkeit der Arbeit	4
4.4. Aufbau der Arbeit	4
4.5. Abkürzungen	4
4.6. Literaturverzeichnis	4
4.7. Zusammenfassung	4
4.8. Zusammenfassung	4
4.9. Zusammenfassung	4
5.1. Einleitung	5
5.2. Zusammenfassung	5
5.3. Zielsetzung und Zweckmäßigkeit der Arbeit	5
5.4. Aufbau der Arbeit	5
5.5. Abkürzungen	5
5.6. Literaturverzeichnis	5
5.7. Zusammenfassung	5
5.8. Zusammenfassung	5
5.9. Zusammenfassung	5
6.1. Einleitung	6
6.2. Zusammenfassung	6
6.3. Zielsetzung und Zweckmäßigkeit der Arbeit	6
6.4. Aufbau der Arbeit	6
6.5. Abkürzungen	6
6.6. Literaturverzeichnis	6
6.7. Zusammenfassung	6
6.8. Zusammenfassung	6
6.9. Zusammenfassung	6
7.1. Einleitung	7
7.2. Zusammenfassung	7
7.3. Zielsetzung und Zweckmäßigkeit der Arbeit	7
7.4. Aufbau der Arbeit	7
7.5. Abkürzungen	7
7.6. Literaturverzeichnis	7
7.7. Zusammenfassung	7
7.8. Zusammenfassung	7
7.9. Zusammenfassung	7
8.1. Einleitung	8
8.2. Zusammenfassung	8
8.3. Zielsetzung und Zweckmäßigkeit der Arbeit	8
8.4. Aufbau der Arbeit	8
8.5. Abkürzungen	8
8.6. Literaturverzeichnis	8
8.7. Zusammenfassung	8
8.8. Zusammenfassung	8
8.9. Zusammenfassung	8
9.1. Einleitung	9
9.2. Zusammenfassung	9
9.3. Zielsetzung und Zweckmäßigkeit der Arbeit	9
9.4. Aufbau der Arbeit	9
9.5. Abkürzungen	9
9.6. Literaturverzeichnis	9
9.7. Zusammenfassung	9
9.8. Zusammenfassung	9
9.9. Zusammenfassung	9
10.1. Einleitung	10
10.2. Zusammenfassung	10
10.3. Zielsetzung und Zweckmäßigkeit der Arbeit	10
10.4. Aufbau der Arbeit	10
10.5. Abkürzungen	10
10.6. Literaturverzeichnis	10
10.7. Zusammenfassung	10
10.8. Zusammenfassung	10
10.9. Zusammenfassung	10

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
Einleitung	1
ALLGEMEINER TEIL	2
<u>1.0 Die Inhaltsstoffe der Enziandroge</u>	
1.1. Nichtphenolische Bitterstoffe	2
1.2. Phenolische Bitterstoffe der Enzian- wurzel	4
1.3. Biosynthese und Stereochemie der Bitterstoffe	5
1.4. Weitere Iridoide	8
1.5. Nichtiridoide Inhaltsstoffe	10
1.6. Pharmakologie	11
1.7. Pharmakopöen	12
1.8. Wertbestimmung	13
1.9. Definition der Bitterstoffe und die Theorie der Geschmacksempfindung	14
<u>2.0 Identitätsprüfung der Enziandroge</u>	
2.1. Bisherige Methoden	17
2.2. Neue chromatographische Methoden	18
2.2.1. Chromatographische Auftrennung und Detektion	18
2.2.2. Chromatographie der Gentiana lutea	20
2.2.3. Diskussion des Chromatogramms	21
2.3. Untersuchung verschiedener Gentiana- Arten	26
2.3.1. Die offizinellen Enziandrogen	26
2.3.1.1. Durchführung der Chromato- graphie	26
2.3.1.2. Diskussion	28
2.3.1.3. Korrelation zwischen Bitter- wert und DC-Auswertung	30

2.3.2. Die nichtoffizinellen Frühlingsenziane	32
 <u>3.0 Isolierung und Strukturaufklärung des Bitterstoffes AP</u>	
3.1. Isolierung	37
3.2. Strukturaufklärung	38
UV-Spektroskopie	38
IR-Spektroskopie	39
NMR-Spektroskopie	42
Massenspektroskopie	45
Circulardichroismus	48
 <u>4.0 Quantitative Analyse</u>	
4.1. Bisherige Methode	51
4.2. Aufgabenstellung	52
4.3. Gehaltsbestimmung der phenolischen Bitterstoffe mit diazotierter Sulfanilsäure	56
4.3.1. Extraktion und DC der Bitter- stoffe	56
4.3.2. Umsetzung mit diazotierter Sulfanilsäure	58
4.3.3. Aufstellung einer Eichgerade	60
4.3.3.1. Amarogentin	60
4.3.3.2. Amaropinin	62
4.3.4. Vergleich der molaren Extinktionen	63
4.3.5. Bezugssubstanz	64
4.3.6. Die molaren Eichgeraden	67
4.3.7. Die irreversible Adsorption an Kieselgel	69
4.3.8. Auswertung	69
4.4. Gehaltsbestimmung von Gentiopikrosid	72
4.5. Anwendungsbeispiele	76
4.5.1. Wertbestimmung von Gentiana pannonica	76

4.5.2. Einfluß der Trocknung auf die Droge	79
a) Vergleich zwischen frischer und getrockneter Wurzel	79
b) Einfluß verschiedener Trocknungsverfahren	81
4.5.3. Vergleich der Methoden zur Bitterwertsbestimmung	82
4.5.4. Verteilung des Amarogentins innerhalb der Wurzel	85
 <u>5.o Zusammenfassung</u>	
 <u>Experimenteller Teil</u>	
6.o <u>Herkunft der Droge</u>	88
7.o <u>Allgemeine Arbeitsmethoden</u>	90
7.1. Absteigende Papierchromatographie	90
7.2. Dünnschichtchromatographie	90
7.3. Präparative DC	92
7.4. Säulenchromatographie	92
7.5. Aufbereitung der Droge	92
7.6. Bestimmung des Wassergehaltes	93
7.7. Organoleptische Bitterwertsbestimmung	93
7.8. Physikalisch-chemische Untersuchungen	93
 <u>8.o Durchführung der Untersuchungen</u>	
8.1. Identifizierung der Bitterstoffe	95
8.2. Charakterisierung der Xanthonver- bindungen	96
8.3. Isolierung von Amaropinin	97
8.3.1. Extraktion	97
8.3.2. Säulenchromatographie	97
8.3.3. Herstellung der Derivate	98
8.3.4. Messwerte von Amaropinin	99
8.4. Quantitative Bestimmung der Enzian- bitterstoffe	104
8.4.1. Vorbereitung der Droge	104

	Seite
8.4.2. Bestimmung von Amarogentin und Amaropanin	105
8.4.2.1. Vorbereitung	105
8.4.2.2. Gehaltsbestimmung mit diazotierter Sulfanilsäure	105
8.4.3. Gehaltsbestimmung von Gentiopikrosid	108
8.4.4. Organoleptische Bitterwerts- bestimmung	109
Literaturverzeichnis	111

E I N L E I T U N G

Die Wertbestimmung von Bitterstoffdrogen erfolgte bisher ausschließlich auf organoleptischem Wege unter Bezug auf reine Standardsubstanzen. Dieses Verfahren, obwohl bisher ohne Abänderung in die meisten Arzneibücher aufgenommen, ist abgesehen von dem hohen Zeitaufwand nur approximativ, da die Ergebnisse von vielen Unsicherheitsfaktoren abhängig und daher großen Schwankungen unterworfen sind.

Versuche, diese Analysenverfahren durch bessere zu ersetzen, scheiterten lange Zeit an dem Fehlen exakter Trennmethode für die einzelnen Bitterstoffe und letztlich an dem noch geringen Wissen über die Chemie der Bitterstoffe.

Da heute die Voraussetzungen für eine chemische Wertbestimmung von Bitterstoffen wesentlich günstiger sind, sollte in der vorliegenden Arbeit ein erster Versuch unternommen werden, an Hand einer Modelldroge, eine derartige Methode auszuarbeiten.

Ausgewählt für diese Untersuchungen wurde die Enzianwurzel, die auch heute noch im Handel zu unseren wichtigsten Bitterstoffdrogen zählt.

A L L G E M E I N E R T E I L

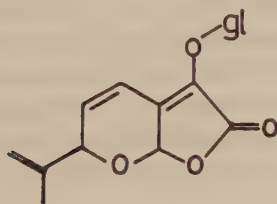
1.0 DIE INHALTSSTOFFE DER ENZIANDROGE

1.1 Nichtphenolische Bitterstoffe

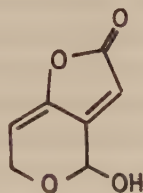
Da die Enzianwurzel schon seit dem Altertum in verschiedenen Zubereitungsformen in der Volksmedizin angewendet wurde, versuchte man schon sehr früh, die Inhaltsstoffe dieser Droge zu isolieren, ihre Struktur aufzuklären und etwas über die pharmakologische Wirksamkeit der Droge zu erfahren. Heute noch ist Radix Gentianae in den Arzneibüchern Europas offizinell.

Die ersten Isolierungsversuche wurden im Jahre 1862 von KROMEYER (1) durchgeführt. Es gelang dem Autor, aus frischen Wurzeln von *Gentiana lutea* einen Bitterstoff zu isolieren, den er Gentiopikrin nannte. Die ersten chemischen Aufklärungsversuche dieses Stoffes wurden erst im Jahre 1900 von BOURQUELOT und HÉRISSEY (2) und später von TANRET (3) unternommen. Dabei wurde die glykosidische Natur und eine Lactongruppierung festgestellt. Im Jahre 1939 beschäftigte sich ASAHINA (4) mit den Inhaltsstoffen des Enzians. Die ersten Strukturvorschläge für das Gentiopikrin stammten von KORTE (5) 1954, der in einer Mitteilungsreihe über die Bitterstoffe des Enzians berichtete. Die Isolierung des Gentiopikrins bereitete große Schwierigkeiten, da sich die Verbindung leicht unter Polymerisation zersetzt. Etwas stabiler erwies sich das Gentiopikrinacetat. Durch vorsichtige Hydrolyse konnte KORTE nur sehr geringe Mengen des reinen Glykosids wiedergewinnen. Während durch Hydrolyse mit Mineralsäuren Gentiopikrin vollständig abgebaut wurde, konnten durch Emulsin-Hydrolyse mehrere Produkte erhalten werden, die Mesogentiogenin (=ölig und optisch inaktiv), Gentiogenin (= dimeres Aglykon) und Eugentiogenin genannt wurden.

Das unveränderte Aglykon konnte nicht isoliert werden. Aufgrund chemischer und spektroskopischer Untersuchungen des Glykosids und des Glykosidacetates machte KORTE für Gentiopikrin folgenden Strukturvorschlag (Ia), 3-Glucosylhydroxy-2-oxo-6-isopropenyl-2,7 α -dihydro-6H-furano (2,3 β)-pyran.

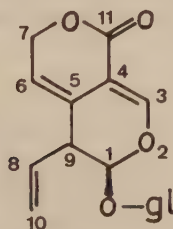


Ia



Patulin

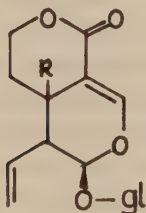
Eine Bestätigung dieser Struktur glaubte er gegeben durch den Vergleich mit dem Antibioticum Patulin, das infolge seiner Halbacetalgruppierung ähnliche chemische Reaktionen gab. Die eigentliche Grundstruktur (Ib) des Gentiopikrins wurde im Jahre 1961 von CANNONICA und Mitarb. (6) bis auf die Lage einer Doppelbindung geklärt. Demnach liegt als Grundkörper ein Pyrano (3,4 c)-dihdropyran vor.



Ib. Gentiopikrosid (gl = β -D-Glucose)

Die endgültige Konstitution (Ib) und die stereochemische Absolutstruktur wurde im Jahre 1968 von INOUE, YOSHIDA und Mitarb. (7) aufgeklärt. Gentiopikrin ist demnach ein 1-Glucosyloxy-11-oxo-9-vinyl-1,9-dihydro-7H-pyrano (3,4 c)-pyran.

Dem Gentiopikrosid strukturell ähnlich sind die beiden Inhaltsstoffe aus *Swertia japonica* Makino, Swertiamarin und Swerosid. Swertiamarin (III) konnte 1961 von KUBOTA und TOMITA (8) als das Iridoidglucosid 5,6-Dihydro-5-hydroxy-Gentiopikrosid aufgeklärt werden. Aus der gleichen Pflanze isolierte INOUE (9) das Swerosid (II), ein 5-Desoxy-swertiamarin.



II R = H, Swerosid
III R = OH, Swertiamarin

In den Wurzeln von *Gentiana*-Arten kommen die beiden letzten Verbindungen verestert mit einer Di- bzw. Trihydroxydiphenylcarbonsäure vor.

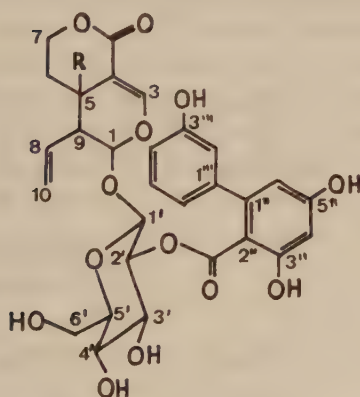
1.2 Phenolische Bitterstoffe der Enzianwurzel

Die Bitterwirkung des Gentiopikrosids, das nach KORTE (5) einen Bitterwert von 12 000 besitzt, reicht nicht aus, um die starke Bitterkeit der Enzianwurzel zu erklären. Die weiteren Untersuchungen führten zur Isolierung eines neuen Bitterstoffes (10, 11), der einen um drei Potenzen höheren

Bitterwert besaß als Gentiopikrosid. Er wurde Amarogentin (IV) genannt. Der Bitterwert betrug 58 000 000 und war um ein zehnfaches höher als der von Brucin. Amarogentin stellt auch heute noch den bittersten bisher bekannten Naturstoff dar.

Die Konstitutionsaufklärung erfolgte im Jahre 1968 durch INOUE (12, 13). Aus *Swertia japonica* Makino isolierte INOUE außer Amarogentin einen zweiten Bitterstoff, den er Amaroswerin (V) nannte. Chemisch stellen diese Bitterstoffe Veresterungsprodukte der Secoiridoidglucoside mit der 3,5,3'-Trihydroxy-1-1'-diphenyl-2-carbonsäure dar.

Amarogentin leitet sich von Swerosid, Amaroswerin von Swertiamarin ab.



IV: R = H Amarogentin

V: R = OH Amaroswerin

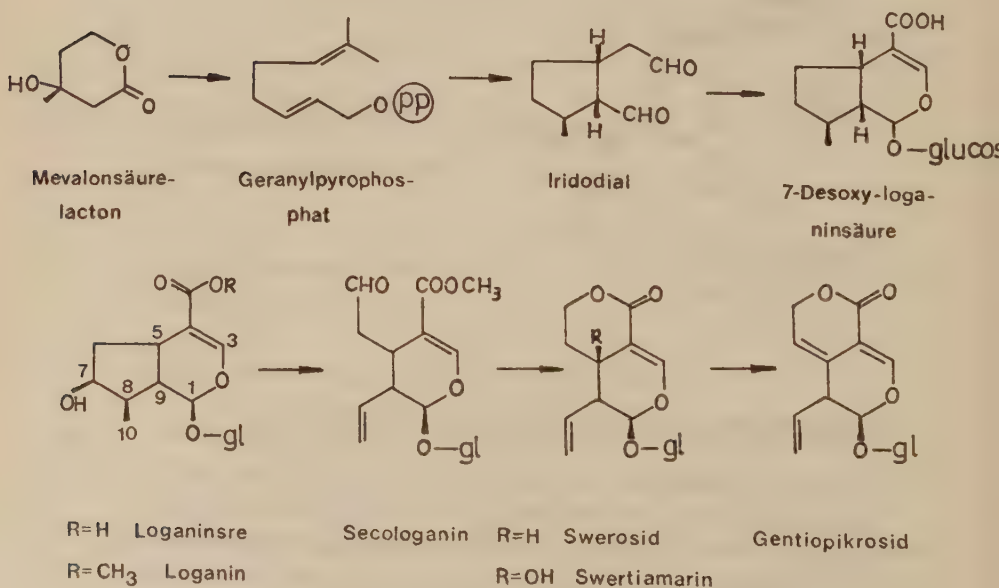
1.3 Biosynthese und Stereochemie der Bitterstoffe

INOUE bezeichnete die Bitterstoffe Gentiopikrosid, Swertiamarin und Swerosid als zur Familie der Iridoide gehörig (14). Ihre biosynthetische Verwandtschaft mit den Iridoidmonoterpenen konnte durch Untersuchungen verschied-

dener Autoren COSCIA und GUARNACCIA (15, 16, 17, 18), GRÖGER und SIMCHEN (19), INOUE (20, 21, 22, 7, 23, 24) mit ^{14}C -markiertem Mevalonsäurelacton gezeigt werden.

Als erstes Produkt entsteht aus Geranylpyrophosphat durch Cyclisierung ein Iridoidkörper (=Iridodial), der in das bicyclische 7-Desoxy-loganin übergeht. Dieses wird über Loganinsäure-Loganin-Secologanin in Swerosid umgewandelt. Weiterhin läßt sich nachweisen, daß aus Swerosid via Swertiamarin Gentiopikrosid entsteht (siehe Schema). Da hierbei die Bindung zwischen C_7 und C_8 gespalten wird (= Secologanin) und das C_7 mit C_{11} einen Lactonring bildet, bezeichnete man die Verbindungen Swerosid, Swertiamarin und Gentiopikrosid als "Secoiridoide" (25).

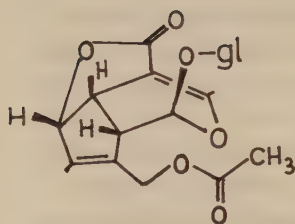
Biosyntheschema der Iridoidbitterstoffe



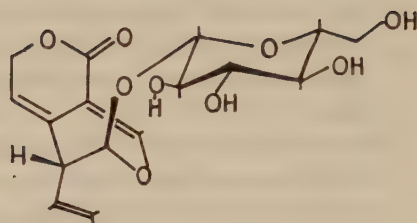
Der gleiche Biosyntheseweg bis zur Stufe des Secologanins wird auch für die Bildung des Nichttryptophanteils der Indolalkaloide beschrieben (26, 27, 28), womit der Zusammenhang innerhalb der Ordnung der Contortae hergestellt ist.

Die nach dem neuen "Syllabus" 1964 dazugehörigen Familien Gentianaceae, Menyanthaceae und die verwandten Oleaceae enthalten den Iridoidkörper in verschiedenen Variationen als Glucoside. Das gleiche C_{10} -Grundgerüst findet sich aber mit Tryptamin zu Indolalkaloiden verknüpft in den anderen Familien der Contortae, den Loganiaceae, Apocynaceae und Rubinaceae, wieder (29).

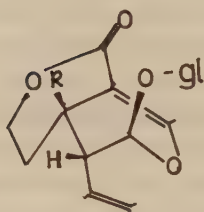
Um die Stereochemie dieser Secoiridoide aufzuklären, wurden von INOUE (7, 30) Umwandlungsversuche mit dem in seiner Absolutstruktur bekannten Asperulosid (VI) zu stereochemisch definierten Produkten durchgeführt. Gleiche Produkte wurden durch milde Reaktionsbedingungen auch von Swerosid erhalten. Die so gefundene Absolutkonfiguration des Swerosids (IIa) als das 5-S, 9-R, 1-R (β -axial-Glucopyranosyloxy-) Stereomere steht in Übereinstimmung mit den NMR-Daten.



VI: Asperulosid



Ic: Gentiopikrosid

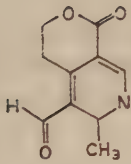


IIa: R = H Swerosid

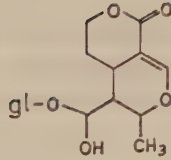
IIIa: R = OH Swertiamarin

1.4 Weitere Iridoide

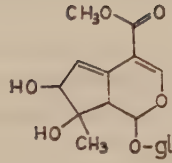
In neueren Veröffentlichungen berichten POPOV und MAREKOV (31, 32) über drei neue iridoide Inhaltsstoffe aus Gentiana-Arten, das Alkaloid Gentioflavin, das biosynthetisch aus Gentiopikrosid entstehen soll und einen anderen dem Aucubin-Typ zugehörigen Stoff, den sie Gentiosid nannten. Dieses Gentiosid ist chemisch verschieden von dem später noch erwähnten Isogentisinprimverosid, das denselben Namen führt. Der dritte Stoff ist Gentioflavosid, das durch Ammoniakbehandlung in das Alkaloid Gentioflavin übergeht. Diese Reaktion verläuft analog der Entstehung von Gentianin aus Gentiopikrosid.



Gentioflavin



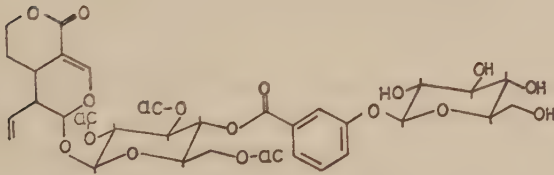
Gentioflavosid



Gentiosid

Durch $^{14}\text{CO}_2$ -Inkubation von *Gentiana asklepiadea* wiesen POPOV und MAREKOV nach, daß zuerst bevorzugt Gentiosid gebildet wird und später daraus Gentiopikrosid entsteht, und somit Gentiosid in der Biosynthesekette zwischen Loganin und Gentiopikrosid zu finden ist.

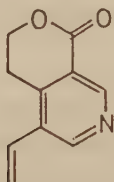
Kürzlich wurde von INOUE (33) aus *Gentiana triflora* Pall. ein neuer Secoiridoid-Bitterstoff isoliert. Für die Verbindung, Triflosid genannt, wurde nachfolgende Struktur ermittelt. Demnach handelt es sich um ein 2',3',6'-Triacetyl-4'-(2"-hydroxy-3"- β -D-glycosyloxy-benzoyl)-swerosid.



Triflosid

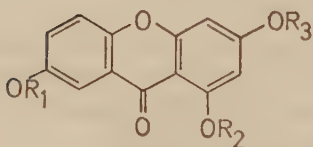
1.5 Nichtiridoide Inhaltsstoffe

Außer den beschriebenen Bitterstoffen fand man in der Enzianwurzel das Alkaloid Gentianin (34), das auch künstlich durch Ammoniak-Behandlung aus Gentiopikrosid entstehen kann (35, 36).



Gentianin

Von Bedeutung sind ferner die verschiedenen Xanthonderivate Gentisin, Isogentisin, Gentisein, 1-Hydroxy-3,7-dimethoxy-xanthon und deren Glykoside (37). Ein Isogentisinprimverosid (= Gentiosid) wird beschrieben.



Gentisin: $R_1 = R_2 = H$
 $R_3 = CH_3$

Isogentisin: $R_1 = CH_3$
 $R_2 = R_3 = H$

Gentisein: $R_1 = R_2 = R_3 = H$

Als weitere Inhaltsstoffgruppe von besonderer Bedeutung sind die Zucker anzusehen. Neben freier Glucose sind in den Wurzeln der verschiedenen Enzianarten die Disaccharide Gentiobiose (1- β -6'-Glucopyranosylglucopyranose) und Saccharose (1- α -2'- β -Glucopyranosylfructofuranosid) und ein Trisaccharid Gentianose (Glucose-1- β -6-Glucose-1- α -2- β -Fructose) enthalten.

Die Besonderheit der Enzianwurzel besteht darin, daß der Reservezucker nicht zu Stärke polymerisiert, sondern als Trisaccharid gespeichert wird.

Der hohe Gehalt an vergärbarem Zucker ist der Grund für die Verwendung zur Herstellung von alkoholischen Getränken. Hier werden vorher fermentierte Wurzeln vergoren, und das Gärprodukt destilliert. Da die Bitterstoffe nicht flüchtig sind, schmeckt das so gewonnene Destillat ("Enzianschnaps") nicht bitter.

Die phenolischen Bitterstoffe sind teilweise noch in dem flüssigen Destillationsrückstand zu finden, Gentiopikrosid wird im Verlauf des Gärungs- und Destillationsprozesses zer-
setzt und ist chromatographisch nicht mehr nachweisbar.

Zu erwähnen bleiben noch O- und C-Flavonglykoside (38, 39) der Vitexin- und Orientinreihe, sowie Pektine und ähnliche Stoffe.

1.6 Pharmakologie

Die Volksmedizin verwendet die Enzianwurzel in erster Linie als Stomachikum. Wie neuere Untersuchungen (40) zeigen, ist eine Steigerung der Magensaftsekretion auf reflektorischem Wege über die Geschmacksnerven festzustellen (41). Gleichzeitig beobachtete man eine Beeinflussung der Magen-Darm-Motorik und eine Stimulierung der Pankreassaftproduktion (42).

Mit der Magensaftsekretion kann auch eine Verdauungsleucocytose auftreten (43). Bei i.v.-Injektion eines Enzianextraktes wird primär ein Leucocytensturz festgestellt, der dann zu einer langanhaltenden starken Blutleucocytose führen kann (44).

Außerdem wird eine Wirkung auf die vegetativen Organe beschrieben. Allgemein wird die Empfindlichkeit dieser Organe gegenüber Adrenalin erhöht (45). Andererseits wird

von Blutdrucksenkung und Uteruskontraktionen berichtet. Die positiv inotrope Wirkung ist umstritten (46).

Die Verwendung als Antipyretikum und die damit verbundene Indikation gegen Malaria und Tbc in der Volksmedizin soll auf einer allgemein antimikrobiellen Wirksamkeit beruhen (47, 48).

In diesem Zusammenhang weist HÄNSEL (49) auf die chemische Ähnlichkeit des Gentiopikrosids mit dem Antibiotikum Patulin (50) hin.

Daneben wird noch die Anwendung als Wurmmittel und zur äußerlichen Behandlung von Wunden und Geschwüren beschrieben. In der Tiermedizin wurden Enzianextrakte gegen Viehseuchen eingesetzt.

Kürzlich berichteten GHOSAL und Mitarb. (51) über die vielseitigen Wirkungen der Xanthon-O-Glykoside, die aus Swertia-Arten isoliert wurden. Es werden sowohl die Wirkung als Monoamino-oxydase-Hemmer als auch tuberkulostatische Eigenschaften beschrieben. Somit dürfte die pharmakologische Wirksamkeit des Enzians nicht allein auf die Bitterstoffwirkung zurückzuführen sein.

1.7 Pharmakopöen

In folgende Arzneibücher wurde die Enzianwurzel aufgenommen: Ph. Eu., DAB 7-BRD und DDR, ÖAB 9, Helv. VI, CF 65, BP 68, Ital. VII, Hisp. IX, Nord. 63, Belg. V, Dan. IX, Ned. 6, Pol. III, CsL 2, Hung. VI, Jug. II, Ind.P.C. 53, Jap. 61, Chil. III, Brasil. 2, Chin.P..

Als Droge werden getrocknete, aber nicht fermentierte, Wurzeln vorgeschrieben. Während manche Arzneibücher als Stamm-

pflanze nur *Gentiana lutea* L. erlauben, werden im deutschen, österreichischen, niederländischen und schweizer Arzneibuch auch *Gentiana pannonica* Scop., *Gentiana purpurea* L. und *Gentiana punctata* L. zur Gewinnung der Droge zugelassen. Die oben genannten Arzneibücher beschreiben Enzian als *Amarum*, also als Magenmittel und zur Behandlung von Appetitlosigkeit. Neben *Radix Gentianae* sind in verschiedenen Pharmakopöen auch *Tinctura Gentianae* und *Extractum Gentianae fluidum* offizinell.

1.8 Wertbestimmung

Zur Wertbestimmung der Enziandroge wird in den Arzneibüchern Europas neben der Bestimmung des Extraktgehaltes eine organoleptische Bitterwertsbestimmung vorgeschrieben. Unter Bitterwert versteht man den reziproken Wert derjenigen Verdünnung eines Drogenauszuges, die eben noch als bitter empfunden wird. Zum Vergleich dient eine bittere Standardsubstanz mit einem festgelegten Bitterwert, z.B. Chininhydrochlorid in DAB 7/BRD und DDR und Helv. VI, mit einem Bitterwert von 200 000. Das ÖAB 9 verwendet Brucin (EW 3 000 000). Nach dem ÖAB 9 wird ausgehend von 1 g Droge der genaue Bitterwert bestimmt. In der ersten Verdünnungsreihe wird mit Hilfe einer Brucinlösung der persönliche Korrekturfaktor bestimmt und in der zweiten Verdünnungsreihe der Bitterwert der Droge. Für *Rad. Gentianae* ist ein Bitterwert von 10 000 vorgeschrieben.

Im Unterschied dazu schreibt das DAB 7/BRD eine Grenzwertbestimmung vor, wobei ein Mindestbitterwert von 10 000 für *Radix Gentianae* verlangt ist. Dies bedeutet, daß unter Berücksichtigung des persönlichen Korrekturfaktors eine Verdünnung von 1 : 10 000 des Drogenauszuges bitter schmecken muß. Nur diese Verdünnung ist zu kosten.

Ähnlich ist die Vorschrift des DAB 7/DDR. Jedoch werden hier zwei Grenzkonzentrationen angegeben, die zu prüfen sind, entsprechend einer oberen und einer unteren Grenze. Umgerechnet bedeutet dies, daß der Bitterwert der Droge über 15 000 und unter 30 000 liegen muß.

Das Schweizer Arzneibuch gibt den Bitterwert in Ph. Helv.-Einheiten pro Gramm an, wobei eine solche Einheit gleichzusetzen ist mit der Bitterwirkung von 0,5mg Chininhydrochlorid. Bei einem Standardbitterwert von 200 000 für Chininhydrochlorid entspricht eine Ph. Helv.-Einheit einem Bitterwert von 100. Für Radix Gentianae ist eine Bitterwirkung von 200 Ph. Helv.-Einheiten, entsprechend einem Bitterwert von 20 000 vorgeschrieben.

Die Tatsache, daß für die Wertbestimmung keine einheitliche Methode existiert, sondern jedes Arzneibuch ein anderes Verfahren vorschreibt, zeigt, wie schwierig es ist, bei der Enzianwurzel die für die Qualität verantwortlichen Bitterprinzipien zu erfassen und einen Maßstab für die Qualitätsbeurteilung zu finden. Die bisher als einzige Methode angewendete organoleptische Prüfung wird nicht als optimal und befriedigend empfunden. Auf ihre Problematik wird im Kapitel 4. S. 51 eingegangen.

1.9 Definition der Bitterstoffe und die Theorie der Geschmacks-empfindung

Als Bitterstoffe werden nur solche N-freie Substanzen bezeichnet, die eine bittere Geschmacksempfindung hervorrufen, aber keine andere ausgeprägte pharmakologische Wirksamkeit besitzen.

Sie sind chemisch nicht einheitlich und der bittere Geschmack läßt sich nicht durch bestimmte chemische Gruppierungen erklären.

Über die Verteilung der Bitterstoffe innerhalb der Pflan-

zenfamilien berichtet Louis PEYRON (52) in der Abhandlung "Les stimuli amers". Überblicksweise werden alle bitterstoffhaltigen Pflanzen in der Systematik genannt, und, soweit bekannt, die Struktur der Bitterstoffe nach chemischen Gesichtspunkten aufgeteilt. In sehr vielen Familien wie Asteraceae, Asklepiadaceae, Cucurbitaceae, Gentianaceae, Lamiaceae, Rutaceae etc., sind Bitterstoffdrogen zu finden. Auch chemisch sind die Bitterprinzipien in allen Stoffklassen zu finden. Besonders häufig treten terpenoide Grundkörper mit Lactoncharakter auf.

Der Zusammenhang zwischen Struktur und Geschmack wurde von SCHALLENBERGER (53) und KUBOTA (54) untersucht. PFEIL (Marburg) (55) berichtet in seiner Abhandlung über "Theorie und Geschmacksempfindung" zusammenfassend über die bisherigen Untersuchungsergebnisse: Während die Empfindungen "sauer" und "salzig" einfach zu erklären sind, (sauer - hervorgerufen durch freie dissoziierte Protonen - und salzig - durch dissoziierte neutrale Salze der Alkaligruppe) bereitet die Erklärung für die Empfindung "süß" und "bitter" Schwierigkeiten. Ein gemeinsames Merkmal ist die Anhäufung von Sauerstofffunktionen.

SCHALLENBERGER (56) untersuchte die Zusammensetzung der Rezeptororgane und Geschmacksstoffe in erster Linie anhand von süßschmeckenden Substanzen. In Analogie dazu sollen die Rezeptoren für den bitteren Geschmack gebaut sein. Eine solche Rezeptoreinheit besteht aus zwei aktiven Zentren, die Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können und aus einer Protonendonator- (AH) und einer Protonenacceptorstelle (B): $R \begin{smallmatrix} \nearrow B \\ \searrow AH \end{smallmatrix}$ im Abstand von ca. 3 Å zusammengesetzt sind.

Im Molekül des süßschmeckenden Stoffes muß eine ähnlich gebaute Einheit vorhanden sein. Der Abstand von 3 Å findet sich bei den OH-Gruppen ringgebundener Polyole wieder. Sie

sind in der Lage, inter- und intramolekulare H-Brückenbindungen einzugehen, wobei die Stärke der Süßkraft eine Funktion der Stärke ihrer H-Brücken ist. Für das Rezeptormodell eignet sich die Säureamidgruppierung aus verschiedenen Aminosäuren wie Glutamin oder Asparagin. Tatsächlich gelang es auch DASTOL und PRICE (57), ein Protein aus den Geschmacksknospen der Rinderzunge zu isolieren, das süßschmeckende Verbindungen zu binden vermag.

Wichtig ist auch die sterische Konfiguration einer Substanz, da wahrscheinlich die Rezeptorstellen dreidimensional angeordnet sind. So schmeckt z.B. das anti-Anisaldehydoxim süß, während das syn-Isomere geschmacklos ist.

An verschiedenen Diterpenen untersuchten KUBOTA und KUPO (54) die Zusammenhänge zwischen bitterem Geschmack und ihrer Bindung an Rezeptoren. Es wird die gleiche Säure-Basen-Einheit AH-B vorausgesetzt wie bei den Rezeptoren für süßschmeckende Stoffe, jedoch beträgt der Abstand von AH und B statt $3 \text{ \AA}$ $1,5 \text{ \AA}$. Dadurch wird eine besonders enge intramolekulare Bindung ermöglicht, die die Voraussetzung für den Geschmack "bitter" sein soll.

2.0 IDENTITÄTSPRÜFUNG DER ENZIANDROGE

2.1 Bisherige Methoden

Die bekannteste bisher zur Identitätsbestimmung herangezogene Methode besteht in der Mikrosublimation der in der Enzianwurzel vorhandenen Xanthonverbindungen (58). Sie können entweder durch die charakteristischen Nadeln von Gentisin oder durch Bildung eines gelben Salzes nach Laugenzugabe identifiziert werden. Auch eine Chromatographie der Xanthone wird von MARKHAM (59) beschrieben. Da die Xanthone wie Gentisin nur Begleitstoffe der Droge sind und in keinem direkten Zusammenhang mit den Bitterstoffen stehen, sagen sie über die eigentliche Qualität der Droge nichts aus.

Eine andere Nachweismethode, die von LUCKNER (60) für das DAB 7/DDR vorgeschlagen und auch von STAHL (61) verwendet wird, beruht auf der Umsetzung des Gentiopikrosids mit Ammoniak, wobei das Kunstprodukt Gentianin entsteht, das danach chromatographisch bestimmt werden kann. Die Methode läßt nur eine Identitätsprüfung aufgrund des in allen Enzianwurzeln enthaltenen Stoffes Gentiopikrosid zu, ermöglicht aber weder den Nachweis der Bitterstoffe in ihrer ursprünglichen Form, noch eine Differenzierung zwischen den einzelnen Verbindungen.

Eine von KORTE (5) vorgeschlagene papierchromatographische Methode erlaubt erstmals den Nachweis des genuinen Bitterstoffes Gentiopikrosid.

Ein Enzianextrakt wird auf Papier in H_2O gesättigtem Butanol als Fließmittelsystem entwickelt. Zur Detektion wird Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in alkalischer Lösung verwendet (62, 63). Die Halbacetalgruppierung des Gentiopikrosids reagiert mit TTC und gibt durch eine Nachbehandlung in wassergesättigter Atmosphäre bei 80° eine Rotfärbung.

Diese Rotfärbung kann auch zur quantitativen photometri-

schen Bestimmung herangezogen werden.

Nachteil dieser Methode ist nicht nur die langwierige und komplizierte Durchführung, sondern auch die Tatsache, daß hiermit der an der Bitterwirkung maßgeblich beteiligte Bitterstoff Amarogentin nicht miterfaßt werden kann.

Im Zuge von Isolierungsarbeiten wurden zwar DC-Nachweise für die Bitterstoffe vorgeschlagen (10, 11, 25), doch wird dabei für jeden Bitterstoff ein neues Fließmittel vorgeschrieben, und die Detektion erfolgt unspezifisch mit Antimon-III-chlorid oder Jod.

Ziel unserer Arbeit war es, eine einfache Chromatographie zu finden, die den Nachweis aller Bitterstoffe in genuiner Form erlaubt.

2.2 Neue Chromatographische Methoden

Wir wählten die Dünnschichtchromatographie als einfachste und beste Methode für die Identitätsprüfung.

2.2.1 Chromatographische Auftrennung und Detektion

Zur Herstellung der Extrakte eignen sich am besten frische Wurzeln, da die gelagerte Droge eine große Menge an Polymerprodukten (64) und Ballaststoffen enthält, die die Extraktion der Inhaltsstoffe erschweren. Grundsätzlich kann aber auch von getrockneter und gelagerter Droge ausgegangen werden.

Dazu werden 2 g zerkleinerte Droge mehrmals mit Methanol mit dem Omni-Mixer extrahiert und filtriert. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum zur Trockene eingengt. Während bei der frischen Droge ein hellgelbgefärbter Trockenrückstand zu erhalten ist, ergibt die gelagerte Droge eine braune sirupöse Masse. Diese Extrakte werden in ca. 10 ml Methanol gelöst. Der unlösliche Anteil besteht hauptsächlich aus den verschiedenen Zuckern (Glucose, Gentiobiose), die mitextrahiert werden. Nach Filtration wird die Lösung auf genau 10 ml mit Methanol aufgefüllt. Auch diese Lösung

enthält noch soviel Zucker, daß sich nach 24 Std. an der Gefäßwand Gentiobiosekristalle ausscheiden. Dadurch nimmt aber die Viskosität der Lösung ab und das Auftragen auf die Chromatographierplatte wird erleichtert. Die Auftrennung erfolgte auf Kieselgel-Fertigplatten mit einem Fluoreszenzindikatorzusatz.

Nach Prüfung zahlreicher Systemkombinationen fanden wir, daß sich als Fließmittel eine Mischung von Aceton/Chloroform p.a./Aqua dest. (8 : 2 : 0,5) am besten eignet. In diesem Laufmittel gelang uns die Trennung und der Nachweis der einzelnen Bitterstoffe und die Abtrennung der für die Bitterwirkung der Droge unwichtigen Inhaltsstoffe. Eine Kammersättigung ist zwar nicht Bedingung, jedoch günstig. Nach einer Laufstrecke von 12 - 15 cm erhielten wir eine ausgezeichnete Trennung.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte zunächst im UV-Licht bei 254 nm, wobei durch Fluoreszenzminderung bereits die wichtigsten Zonen markiert werden konnten. Das Betrachten bei UV 366 nm lieferte weitere Zonen.

Als Sprühreagens eignet sich am besten eine 0,2 %ige wässrige Lösung von Echtrotsalz E der Firma Serva (65). Bei Zimmertemperatur wird die maximale Farbtintensität nach ca. 10 Min. erreicht.

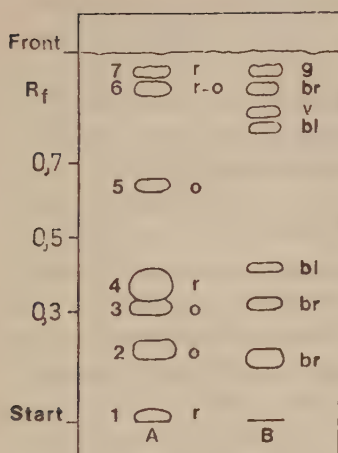
Durch anschließendes Besprühen mit 0,1 m Natriumborat-Lösung (pH=9) wird eine Intensivierung der Farben erreicht. Nach dem Betrachten bei Tageslicht kann danach erneut mit 20 %iger Natriumcarbonat-Lösung besprüht werden (pH = 12). Bei Amarogentin tritt dadurch eine Farbänderung nach purpurrot ein, und Gentiopikrosid wird für kurze Zeit violett, verblaßt danach aber völlig.

Ergänzende Nachweisreaktionen:

- a) Ein sehr empfindliches Reagens auf Amarogentin ist Echtblausalz B (66). Nacheinander wird mit 0,5 %iger wässriger Echtblausalzlösung und 0,1 n NaOH-Lösung besprüht. Dadurch kann man noch µg-Mengen von Amarogentin nachweisen.
- b) Die Differenzierung der einzelnen phenolischen Bitterstoffe, die noch besprochen werden, gelingt am besten durch Besprühen mit einer 0,1 %igen Echtschwarzsalz K-Lösung und anschließendes Erhitzen auf 110° (67).
- c) Durch die Reaktion mit Anthron/Schwefelsäure (68) und anschließendes Erhitzen bei 110° können die zuckerhaltigen Verbindungen, die eine grün-blaue Färbung ergeben, nachgewiesen werden. Amarogentin zeigt nur eine braune Färbung.
- d) Durch die Behandlung mit Formalin/Schwefelsäure (1:9) und anschließendes Erhitzen auf 130° (69) erscheinen die Bitterstoffe im Tageslicht mit brauner Farbe.
- e) Zum Nachweis des Gentiopikrosids kann die von KORTE beschriebene Reaktion mit TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid) durchgeführt werden.

2.2.2 Chromatographie von Gentiana lutea

Das Nachweisverfahren soll am Beispiel der *Gentiana lutea* L. Wurzel erläutert werden, die den größten Teil der Handelsdroge ausmacht und in allen Arzneibüchern als Hauptdroge zugelassen ist. Durch Vergleich mit authentischen Substanzen und Aufnahme von UV-Spektren nach präparativer Dünnschichtchromatographie konnten wir die Bitterstoffe identifizieren. Die nachfolgende Abbildung gibt das Chromatogramm-Schema für einen 20 %igen Methanol-Extrakt aus *Gentiana lutea* wieder.



Laufmittel: Aceton/Chloroform/
Wasser (8:2:0,5)

Detektion: UV-254 nm und 360 nm

Sprühreagenz: Echtrotsalz B

r = rot

o = orange

g = gelb

bl = blau

br = braun

v = violett

A: Die Fluoreszenzminderung unter
UV 254 nm, daneben die Angabe
für die Färbung dieser Zonen
mit Echtrotsalz B

B: Fluoreszenz bei UV 360 nm

Abb.1: Dünnschichtchromatogramm der Inhaltsstoffe aus
Gentiana lutea

2.2.3 Diskussion der Chromatogramme

Wie das durch Fluoreszenzminderung und Anfärben mit Echtrotsalz B erhaltene Chromatogrammschema zeigt, bleiben die Zucker am Start und die Xanthon-Verbindungen laufen in die Lösungsmittelfront. Die Bitterstoffe Gentiopikrosid und Amarogentin sind im mittleren R_f-Bereich zu finden.

Die bei UV 254 nm erkennbaren Zonen (1 - 7) sind für eine Identitätsprüfung ausschlaggebend.

Die Fluoreszenz bei UV 360 nm kann zum Nachweis von einigen Begleitstoffen dienen. Die Bitterstoffe zeigen keine Eigenfluoreszenz.

Mit Echtrotsalz B (diazotiertes 5-Nitro-2-aminoanisol·ZnCl₂) liefern die phenolischen Substanzen eine orange bis rote Färbung.

Gentisin (S 6) und Amarogentin (S 5), die beide mehrere phenolische OH-Gruppen enthalten, geben orangefarbene Diazoprodukte.

Gentiopikrosid (S 4) und die Zucker (S 1) geben als reduzierende Verbindungen eine rote Färbung.

Die Substanzen 1 - 7:

S 1: Am Startpunkt die Zucker Glucose, Gentiobiose und Gentianose.

Ihre Differenzierung ist in diesem Laufmittelsystem nicht möglich. Mit Echtrotsalz B geben die Zucker eine Rotfärbung.

S 2: Bei $R_f = 0,2$ befindet sich ein Fleck, der im UV 360 nm mit brauner Fluoreszenz zu sehen ist und mit Phenol-reagentien positiv reagiert.

Mit Echtröt-Salz B entsteht eine beständige Orange-färbung. Das Besprühen mit Na-borat und Na-carbonat intensiviert den Farbton. Durch präparative Dünnschichtchromatographie wurden kleine Mengen dieser Substanz isoliert und ein UV-Spektrum aufgenommen. Die Substanz 2 zeigte den gleichen Kurvenverlauf wie die Xanthone. Die Prüfung auf Zucker ergab positive Reaktionen. Außerdem ließ der tiefe R_f -Wert auf ein Xanthon-diglykosid schließen. Als Hydrolyseprodukte erhielten wir als Aglykon Gentisin. Als Zuckeranteil konnte durch Chromatographie auf Cellulose-Fertigplatten in dem Fließmittel Äthylacetat/Pyridin/Wasser (2:1:2)-Oberphase Glucose ($R_f = 0,49$) und eine andere Hexose ($R_f = 0,43$) nachgewiesen werden. Der Verdacht auf Gentioid (= Isogentisin-primverosid) ließ sich nicht bestätigen, da keine Xylose ($R_f = 0,61$) gefunden wurde. Für Gentisin wurde nach präparativer Dünnschichtchromatographie ein UV-Spektrum aufgenommen, das nach Zugabe von Na-acetat bzw. Al-chlorid die

für Xanthone charakteristische Verschiebung (39) zeigte.

S 3: Dieser Fleck ist besonders bei Extrakten aus älteren Drogen zu finden. Die braune Fluoreszenz bei UV 360 nm und die Reaktion mit Phenolreagentien ließen vermuten, daß es sich auch hier um eine Xanthon-Verbindung handelt. Die UV-Kurve dieses Stoffes zeigte 3 Maxima bei 210, 272 und 330 nm. Vergleicht man diese mit den Spektren der kürzlich von GHOSAL und Mitarb. (51) beschriebenen Xanthon-O-glykosiden, so liegt der Schluß nahe, daß S 3 ebenfalls ein Xanthon-O-Glykosid darstellt. Der Rf-Wert von S 3 würde ebenfalls einem Monoglykosid entsprechen. Außerdem wäre die Zunahme der Konzentration dieses Stoffes durch Lagerung der Droge damit zu erklären, daß aus dem Xanthondiglykosid (S 2) durch Abspaltung eines Zuckers das Monoglykosid entsteht.

Diese Zone bildet ebenfalls mit Echtröt-Salz B eine beständige Orangefärbung, die wie bei S 2 durch Nachbesprühen intensiviert wird. Da aber für uns nur die Bitterstoffe von Interesse waren, wurde diese Zone nicht näher untersucht.

S 4: Durch chromatographische und spektroskopische Vergleiche mit authentischer Substanz konnte diese Zone eindeutig als Gentiopikrosid identifiziert werden.

Platten, die längere Zeit an der Luft gelegen haben, zeigen im Tageslicht eine Verfärbung des Gentiopikrosidflecks nach gelb. Dieser Fleck, der vorher bei UV 360 nm keinerlei Eigenfluoreszenz besaß, fluoresziert nach der Verfärbung bei dieser Wellenlänge weißlich. Diese Abbaureaktion kann durch Aufbewahren der Platte im Exsiccator verzögert werden. Der verfärbte Gentiopikrosidfleck wurde mit Methanol eluiert und in der-

selben Weise wie oben chromatographiert. Dabei waren drei Zonen nachzuweisen: Glucose, geringe Mengen Gentiopikrosid und an der Laufmittelfront Abbauprodukte des Aglykons, die auch die Fluoreszenz verursachen. Diese Zone entspricht dem Fleck 7.

Das Besprühen mit Echtröt-Salz und 5-minütiges Liegenlassen an der Luft führt zu einer rot-orangen Färbung. Die maximale Farbintensität wird nach weiteren 5 Min. erreicht. Nachbesprühen mit Natriumborat verstärkt die Färbung. Durch erneutes Besprühen mit Natriumcarbonat vertieft sich die Färbung kurzzeitig nach violett und verblaßt danach bis zu einer weiß-gelblichen Tönung. Die Reaktion des Gentiopikrosids mit Echtrötsalz B ist konzentrationsabhängig. Die Nachweisgrenze liegt bei 30 - 50 µg. Durch die Fluoreszenzminderung kann man aber bereits 10 µg Gentiopikrosid erkennen.

- S 5: Die Zone 5 war mit Amarogentin identisch. Durch Ablösen geringster Mengen Kieselgel kann man diese besonders bittere Zone organoleptisch nachweisen.

Neben der Fluoreszenzminderung kann die Reaktion mit Echtrötsalz B zur Identifizierung benutzt werden. Sofort nach dem Besprühen tritt eine Orangefärbung auf, die durch Natriumborat intensiviert und durch Natriumcarbonat nach purpurrot verändert wird.

- S 6: Die bei 360 nm braunfluoreszierende Zone 6 vereinigt Gentisin und ähnlich strukturierte Xanthone. Eine weitere Differenzierung wurde nicht durchgeführt.

Auch diese Xanthone geben mit Echtrötsalz eine beständige intensive rot-orange-Färbung, die weder durch Natriumborat noch durch Natriumcarbonat verändert wird.

S 7: Dieser Fleck enthält die Zerfallsprodukte bzw. Umwandlungsprodukte der Bitterstoff-Aglyka. Man kann sie an ihrer fahlgelben Fluoreszenz bei 360 nm erkennen.

Mit Echtrotsalz erhält man eine rote Färbung. Weiteres Besprühen mit Natriumborat verändert den Farbton nicht.

Nachstehend sind in einem Schema die UV-Fluoreszenzen und die Farbreaktionen der einzelnen Verbindungen mit Echtrotsalz B wiedergegeben.

Farbtabelle zu DC-Schema auf Seite 21:

Substanz	UV 254 nm	UV 360 nm	Echtrotsalz B		
			neutral	pH 9	pH 12
S 1: Zucker	-	-	rot	rot	rot
S 2: Xanthon-diglykosid	+	braun	orange	rot	rot
S 3: Xanthon-O-glykosid	+	braun	orange	rot	rot
S 4: Gentiopikrosid	+	-	rot	rot	violett (verblaßt)
S 5: Amarogentin	+	-	orange	orange	purpur
S 6: Gentisin u. Isomere	+	braun	rot-orange	rot	rot
S 7: Aglykonzerfallprod.	+	gelb	rot	rot	rot

Tabelle 1

2.3 Untersuchung verschiedener Gentiana-Arten

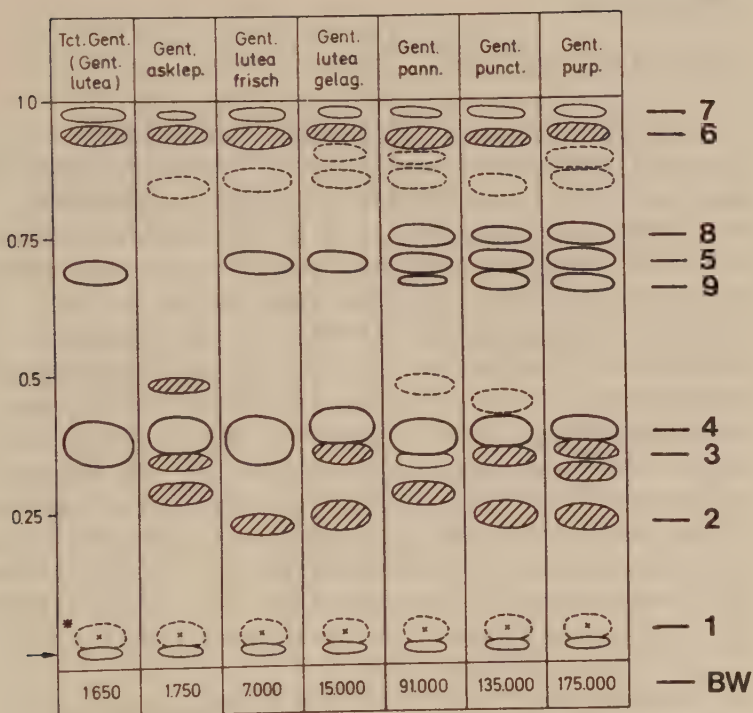
2.3.1 Die offizinellen Enziandrogen

In den meisten europäischen Arzneibüchern sind außer *Gentiana lutea* auch die besonders im Alpenraum verbreiteten Wurzeln der *Gentiana pannonica* Scop., *Gentiana punctata* L. und *Gentiana purpurea* L. offizinell. Diese drei letztgenannten Drogen sind wegen ihres besonders hohen Bitterwertes von Bedeutung. Sie haben einen Bitterwert von ca. 100 000 - 200 000, während *Gentiana lutea* einen durchschnittlichen Bitterwert von ca. 20 000 aufweist. Im DAB 7/DDR ist auch noch *Gentiana asklepiadea* L. zugelassen, sofern die Wurzeln den vorgeschriebenen Bitterwert von 15 000 erreichen. Diese fünf Enzian-Arten wurden chromatographisch untersucht.

2.3.1.1 Durchführung der Chromatographie

Es wurden Methanol-Auszüge gleicher Konzentration, ausgehend von 1 g Wurzel, wie auf Seite 18 beschrieben, hergestellt. 50 µl der zu 5 ml aufgefüllten Endlösung wurden auf Kieselgel-60-F₂₅₄-Fertigplatten, in dem Fließmittel Aceton/Chloroform/Wasser (8:2:0,5) chromatographiert.

Das folgende Bild zeigt die Verteilung der verschiedenen Bitterstoffe in den einzelnen Wurzeln:



1 Zucker

2 Gentisindiglykosid

3 Gentisin-o-glykosid ?

4 Gentiopikrosid

5 Amarogentin

6 Gentisin + Isomere

7 Aglycon-Zersetzungsprod.

8 Amaropanin

9 Amaroswerin



Färbung mit Echtrotsalz B bei Tageslicht + Fluoreszenzminderung bei UV 254 nm



Substanzen mit brauner Fluoreszenz bei UV 366 nm



sichtbar nur bei UV 366 nm (blaugrün)



sichtbar erst nach Besprühen mit Echtrotsalz B

Abb. 2: DC-Schema der offiziellen Enzianarten

2.3.1.2 Diskussion

Gentiana pannonica Scop.

In *Gentiana pannonica* fiel uns neben den bereits bei *Gentiana lutea* beschriebenen Bitterstoffen Gentiopikrosid und Amarogentin, eine unbekannte Substanz 8, vorläufig AP genannt, auf, die einen stark bitteren Geschmack aufwies. Sie zeigte wie Amarogentin eine Fluoreszenzminderung bei UV 254 nm und ließ sich mit Phenolreagentien wie diazotierte Sulfanilsäure anfärben. Mit Echtrotsalz B wurde diese Verbindung gelb. Erst durch Nachbesprühen mit Natriumcarbonatlösung entstand eine purpurrote Färbung. Mit Echtblausalz B gab es keine Reaktion. Am besten ließ sich die Differenzierung von Verbindung S 8 und den beiden anderen bekannten phenolischen Bitterstoffen Amarogentin und Amaroswerin, mit Echtschwarzsatz K (diazotiertes p-Nitro-benzolazo-2,5-dimethoxyanilin • Zn Cl_2) durchführen. Mit diesem Reagens färbte sich dieser neue Bitterstoff rot an, während die anderen blaue Färbungen ergaben.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Farbreaktionen der Bitterstoffe mit den genannten Sprühreagentien:

Tabelle 2: Farbreaktionen der Bitterstoffe

	Echtrotsalz neutral	Echtblausalz B	Echtschwarz- salz K	Diazotierte Sulfanilsäure
Amaropanin (AP)	gelb	-	rot	gelb-orange
Amarogentin	orange	rot-violett	blau	gelb-orange
Gentiopikrosid	rot-orange	-	-	-

	Anthron- H_2SO_4	Formalin H_2SO_4	TTC
Amaropanin (AP)	braun	braun	-
Amarogentin	braun	braun	-
Gentiopikrosid	grün-blau	braun	rot

Amaroswerin gibt stets die gleichen Reaktionen wie Amarogentin

Die Isolierung der Verbindung S 8 = AP und die Struktur-
aufklärung wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

Durch DC war leicht nachzuweisen, daß AP auch in den bei-
den anderen offizinellen Gentianaarten (*Gentiana purpurea*
und *punctata*) vorkommt. Die genannten drei Stammpflanzen
besitzen einen besonders hohen Bitterwert. Dieser wird
durch den zusätzlichen Gehalt an AP erklärt.

Gentiana purpurea L. und Gentiana punctata L.

In *Gentiana purpurea* war außer AP auch Amaroswerin S 9,
das bisher nur in *Swertia*-Arten beschrieben wurde, nachzu-
weisen. In Bezug auf die Zusammensetzung der Bitterstoffe
zeigte *Gentiana punctata* das gleiche Bild wie *Gentiana*
purpurea. Meistens sind alle drei phenolischen Bitter-
stoffe in den drei genannten Enzianarten (*Gentiana pannonica*,
purpurea und *punctata*) gleichzeitig, jedoch in unterschied-
lichen Konzentrationen, enthalten.

Gentiana asklepiadea L.

Der sogenannte Schwalbenschwanzenzian gilt heute noch in
den meisten Arzneibüchern als Verfälschung. Wir untersuch-
ten Wurzeln von *Gentiana asklepiadea* aus verschiedenen Her-
künften des Voralpenlandes und Jugoslawiens. In den meisten
Wurzeln war kein Amarogentin nachzuweisen. Nur 2 von 10
Proben enthielten Spuren von Amarogentin. Der Bitterwert
war dementsprechend gering. Er betrug maximal ca. 4 000.

2.3.1.3 Korrelation zwischen Bitterwert und der DC-Auswertung

Um den Zusammenhang zwischen Bitterwert und Gehalt an
phenolischen Bitterstoffen deutlich zu machen, bestimmten
wir organoleptisch nach dem ÖAB 9 die Bitterwerte (BW)
der chromatographierten Auszüge:

1) <i>G. lutea</i> , gelagert		BW 15 000
2) <i>G. lutea</i> , frisch, H_2O -haltig		BW 7 000 (bezogen auf Frischgewicht)
3) <i>G. pannonica</i>	} frische, getrocknete Wurzeln	BW 91 000
4) <i>G. purpurea</i>		BW 175 000
5) <i>G. punctata</i>		BW 135 000
6) <i>G. asklepiadea</i>		BW 1 650

Vergleicht man diese mit der Chromatogrammskizze auf S.27 , so läßt sich entnehmen, daß mit steigender Anzahl der phenolischen Bitterstoffe der Bitterwert der Droge ansteigt. Daraus ergibt sich, daß man aus dem chromatographischen Bild eines Drogenauszuges seinen Bitterwert abschätzen kann.

Chromatographisch kann man demnach die Enziandrogen in drei Gruppen einteilen. Sie unterscheiden sich auch deutlich in den Bitterwerten.

- 1) Den niedrigsten Bitterwert hat Gentiana asklepiadea (1 500 - 2 000). Als einziger Hauptbitterstoff ist Gentiopikrosid enthalten. Amarogentin ist nicht oder nur in geringsten Mengen vertreten.
- 2) Hiervon zu unterscheiden ist Gentiana lutea. Neben Gentiopikrosid ist als Vertreter der phenolischen Bitterstoffe nur Amarogentin nachzuweisen. Der durchschnittliche Bitterwert liegt bei 15 000 - 20 000.
- 3) Die dritte Gruppe bilden die stark bitteren Enzianarten, Gentiana pannonica, purpurea und punctata, die außer Gentiopikrosid auch alle bekannten phenolischen Bitterstoffe enthalten. Ihr Bitterwert ist wesentlich höher und beträgt 80 000 - 180 000.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß man *Gentiana asklepiadea* nur dann als Stammpflanze einer Arzneibuch-

droge zulassen sollte, wenn eine genügend hohe Amarogentinkonzentration vorhanden ist.

2.3.2 Die nichtoffizinellen Frühlingsenziane

Über die Verteilung der verschiedenen Bitterstoffe in der Gentianaceen-Familie erschienen 1954 verschiedene Arbeiten. KORTE (29) untersuchte eine Reihe von Arten der Gentianaceae und Menyanthaceae und fand Gentiopikrosid in allen Vertretern der Gentianaceae, während in den Menyanthaceae nur Loganin zu finden war. Chemotaxonomisch bedeutet das nach KORTE, daß die Einteilung der Contortae nach Wettstein, der die Menyanthaceae und die Gentianaceae als gesonderte Familie ansieht, eher zu befürworten ist als die Auffassung Hegis, der die Menyanthoideae als eine Unterfamilie der Gentianaceae betrachtet. Aus neueren Untersuchungen (70, 71) geht hervor, daß nicht in allen Gentianaceen Gentiopikrosid selbst enthalten ist. Stattdessen ist oft ein anderer, ähnlich gebauter Secoiridoid-Bitterstoff anzutreffen. Um die Verteilung der verschiedenen Bitterstoffe innerhalb der Gentiana-Arten festzustellen, versuchten wir, möglichst viele verschiedene Pflanzen zu untersuchen. Von jeder Art wurden mehrere Proben verschiedener Standorte chromatographiert, um ein repräsentatives DC-Scheme zu erhalten. Die meist blau blühenden Wiesenenziane haben keinerlei pharmazeutische Bedeutung. Die Wurzeln sind schmal und klein. Sie stehen wie alle anderen Enzianarten auch unter Naturschutz.

Wir untersuchten die Wurzeln folgender Gentiana-Arten:

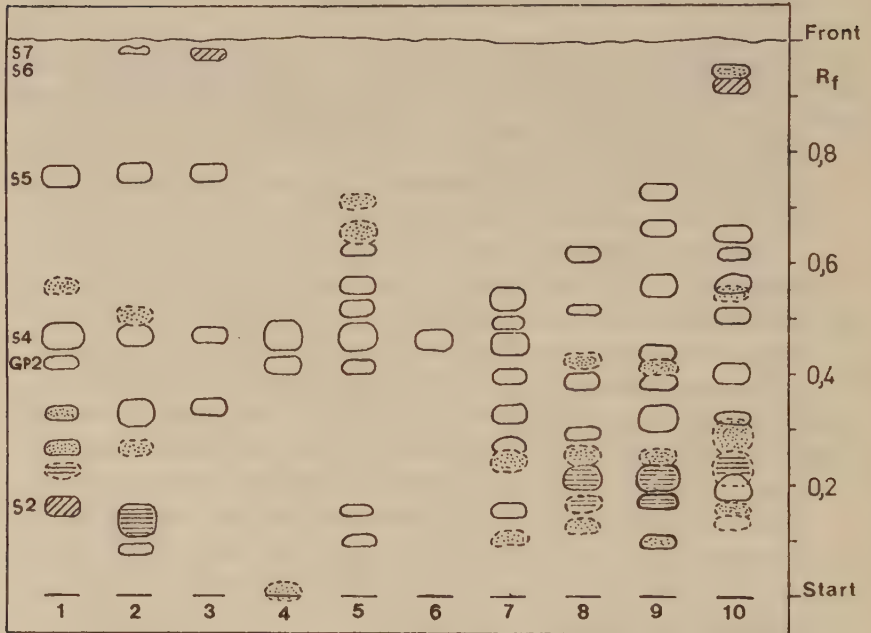
- 1) *Gentiana kochiana* Perr. et Song. (breithlättriger Enzian)
- 2) *Gentiana clusii* (blau blühend) Perr. et Song. }
- 3) *Gentiana clusii* (weiß blühend) Perr. et Song. } stengello-
- 4) *Gentiana cruciata* L. (Kreuz-Enzian) } ser Enzian
- 5) *Gentiana septemfida* Pall.
- 6) *Gentiana sino-ornata* Balf.

- 7) *Gentiana aspera* Hegtschw. em Br. Bl. (*G. campestris* L.
rauher Enzian)
- 8) *Gentiana verna* L. (Frühlings-Enzian, Schusternagerl)
- 9) *Gentiana tergestina*
- 10) *Gentiana nivalis* (Schnee-Enzian)

Methanolauszüge der 10 genannten Enzian-Wurzeln wurden in der gleichen Reihenfolge 1 - 10 auf die DC-Platte aufgetragen. Das Chromatogramm wurde anschließend bei UV 254 nm und UV 360 nm betrachtet.

(Siehe Abb. 3, Seite 34)

DC-Schema der nichtoffizinellen Frühlingsenziane



- /// braune Fluoreszenz bei UV 360 nm
- blaue Fluoreszenz bei UV 360 nm
- === gelbe Fluoreszenz bei UV 360 nm
- Fluoreszenzminderung bei UV 254 nm
- Fluoreszenz bei UV 360 nm

Laufmittel:

Aceton/Chloroform/Wasser
(8:2:0,5)

Detektion

UV: 254 nm und 360 nm

Sprühreagens:

Echtrotsalz B

Abbildung 3

Diskussion

Wie aus dem Schema zu ersehen ist, ist die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe in diesen Pflanzen nicht einheitlich.

Gentiana kochiana und Gentiana clusii enthalten neben viel Gentiopikrosid auch Amarogentin. Außerdem zeigt Gentiana kochiana unterhalb des Gentiopikrosids einen fluoreszenzmindernden Fleck (GP 2).

Einige Begleitstoffe zeigen eine Fluoreszenz bei UV 360 nm bei Rf 0,12 das braun-fluoreszierende Xanthonglykosid, etwas darüber bei Rf 0,28 ein gelb-grüner Fleck und bei Rf 0,5 ein blau-fluoreszierender Fleck. Die Substanz GP 2 dürfte unseren Untersuchungen nach mit Swertiamarin identisch sein.

Es ist ebenfalls ein Glucosid. Das UV-Spektrum zeigt ein Maximum bei 238 nm.

Ähnlich sieht das Chromatogramm von Gentiana clusii aus. Jedoch ist der Gehalt an Amarogentin und Gentiopikrosid wesentlich geringer, und die blau-fluoreszierende Zone fehlt. Auch GP 2 war nicht enthalten.

Die anderen genannten Enzianarten enthielten kein Amarogentin, aber mit Ausnahme von Gentiana verna alle Gentiopikrosid.

In Gentiana verna war der Fleck GP 2 zu finden und eine stark gelb-fluoreszierende Zone bei Rf 0,15, die der Identifizierung dienen kann.

Anhand der Chromatogrammbilder läßt sich eine Zuordnung der Arten treffen. Außerdem ist eine gewisse Gruppeneinteilung möglich.

Eine Gruppe enthält Amarogentin und Gentiopikrosid, die zweite nur Gentiopikrosid und bei der dritten ist nicht einmal Gentiopikrosid nachzuweisen.

So sind auch große Unterschiede in der Intensität des bitteren Geschmacks zu beobachten. Stark bitter schmecken die Amarogentin-haltigen Arten *Gentiana kochiana* und *Gentiana clusii*. Die anderen haben nur einen schwach bitteren Geschmack. *G. verna* ist fast nicht bitter.

Die Blätter aller dieser offizinellen und nichtoffizinellen Enzianarten zeigen im Chromatogramm im R_F -Bereich von 0 - 0,5 etwa das gleiche Bild wie die Wurzeln, jedoch fehlen die Flecke oberhalb $R_f = 0,5$. So ist z.B. Gentiopikrosid immer noch nachzuweisen, während Amarogentin durchwegs fehlt.

3.0 ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG DES BITTERSTOFFES AP

Bei den chromatographischen Untersuchungen von *Gentiana pannonica*-Extrakten war uns im Rf-Bereich oberhalb von Amarogentin eine Substanz (AP) aufgefallen, die einen stark bitteren Geschmack aufwies (s. Kap., 2.3.1, Seite 28. Der Bitterwert lag in der Größenordnung des Amarogentins.

Da bei einer chemischen Gehaltsbestimmung alle Bitterstoffe erfaßt werden müssen, war es nötig, die Struktur dieser Substanz aufzuklären. Durch DC und weitere Vorproben wurde sichergestellt, daß es sich hier um einen neuen, bisher nicht beschriebenen phenolischen Bitterstoff handeln mußte.

3.1 Isolierung

Frische zerkleinerte Wurzeln wurden so lange mit Methanol extrahiert, bis der Rückstand nur mehr schwach bitter schmeckte. Die methanolische Lösung wurde im Vakuum eingengt und in Wasser aufgenommen. Die weitere Fraktionierung erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von KORTE und INOUE (5, 25). Während bei diesen Vorschriften zuerst mit Chloroform ausgeschüttelt und diese Phase verworfen wird, stellten wir fest, daß AP in Chloroform löslich war. Deshalb begannen wir die Ausschüttelungsreihe mit Benzol. Diese Phase konnte verworfen werden. Die zurückbleibende wässrige Phase wurde danach portionsweise mit Chloroform ausgezogen. In dieser Fraktion war AP als einziger Bitterstoff enthalten.

Anschließend wurde die wässrige Lösung mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Hierdurch wurde der Rest an AP und das Amarogentin der wässrigen Phase entzogen.

Da durch die nachfolgende Kieselgelsäule eine Trennung von AP und Amarogentin möglich war, konnte die Chloroformausschüttelung unterbleiben.

Im Hauptversuch wurde daher die eingeeengte Äthylacetatphase auf einer Kieselgelsäule mit Chloroform und Chloroform-Methanol-Mischungen mit steigenden Mengen Methanol eluiert. Die Trennung dauerte einige Tage.

Die Eluate mit Chloroform und Chloroform : Methanol (97:3) waren frei von Bitterstoffen. Mit diesen Fraktionen wurden Verunreinigungen, wie Xanthonfarbstoffe, abgetrennt. Da AP besser in Chloroform löslich ist als Amarogentin, erfolgte bei der Abtrennung der Verunreinigungen bereits eine Vortrennung der beiden Bitterstoffe auf der Säule. Mit Beginn des dritten Laufmittelgemisches Chloroform : Methanol (93:7) wurde die Säule an einen Fraktionssammler angeschlossen. Die AP- und amarogentinhaltigen Fraktionen wurden nach DC-Untersuchung zusammengefaßt.

Man erhält zunächst AP und nach wenigen Mischfraktionen Amarogentin. Die Lösungen sind so rein, daß sie nach Einengen direkt zum Auskristallisieren aufgestellt werden können. Die Umkristallisation des AP erfolgte aus Chloroform p.a./Benzol p.a. Wir nannten diesen Stoff Amaroparin.

Amaroparin gibt farblose Nadeln vom Schmp. 178°C und dreht stark links: $[\alpha]_{20}^D = -101^{\circ}$ (in Methanol).

3.2. Strukturaufklärung

Das UV-Spektrum zeigt für Amaroparin Maxima bei 210 und 215 nm ($\log \epsilon = 4,39$ und $3,48$) und eine Schulter bei 240 nm. Durch Zugabe von methanolischer NaOH verschwindet die Schulter, die Maxima werden nicht verändert. Im Gegensatz dazu konnten wir bei Amarogentin durch Zugabe von NaOH eine bathochrome Verschiebung beobachten. Die ursprünglich vorhandenen Maxima bei 226, 262 und 304 nm wurden im alkalischen Milieu nach 240 und 307 nm verschoben.

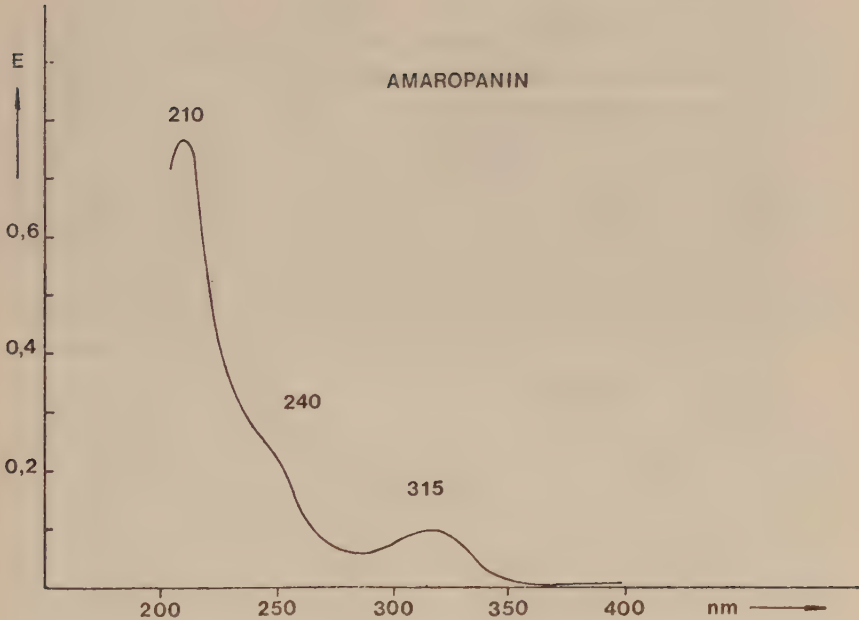


Abb. 4: UV-Spektrum des Amaropanins

Das IR-Spektrum des Amaropanins wurde mit den Spektren von Amarogentin und Amaroswerin verglichen, um festzustellen, ob Swerosid oder Swertiamarin als Geninteil vorliegt. Allen Spektren gemeinsam waren die für diese Stoffgruppen charakteristischen Banden bei 3400, 1680, 1600, 1430, 1240, 1050, 890, 780 cm^{-1} .

In der Feinstruktur erwies sich das Amaropanin-Spektrum dem des Amarogentin sehr ähnlich. Es unterschied sich aber deutlich vom Spektrum des Amaroswerins. Die bei Amaropanin und Amarogentin auftretenden starken Banden bei 1580, 1310,

1220, 1020, 980, 830, 700 cm^{-1} fehlten bei Amaroswerin oder waren nur schwach ausgebildet. Für Amaroparin typische Banden waren eine breite OH-Bande bei 3400 cm^{-1} und die Carbonylbande des Lactons bei 1680 cm^{-1} , außerdem die Bande konjugierter Doppelbindungen bei 1600, 1580, 1480, 1460, 753, 700 cm^{-1} , die vom phenolischen Teil des Moleküls stammen. Die Absorption bei 1600 cm^{-1} wird von der chelatisierten phenolischen OH-Gruppe gebildet. Die starke Bande bei 990 cm^{-1} zeigt die Endvinylgruppe an. Daneben sind noch C-O-Valenzschwingungen (1065) zu sehen. Unterschiede zu Amarogentin sind im Fingerprint-Bereich feststellbar.

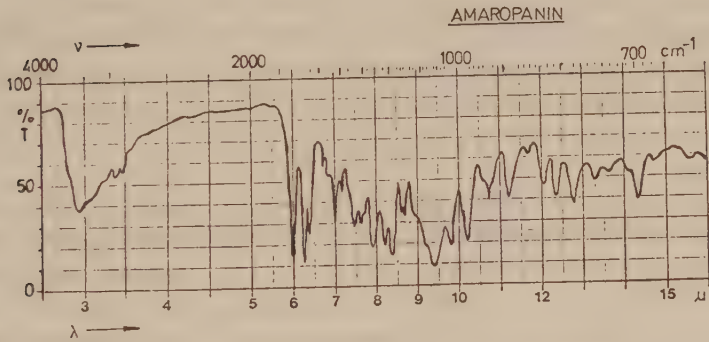
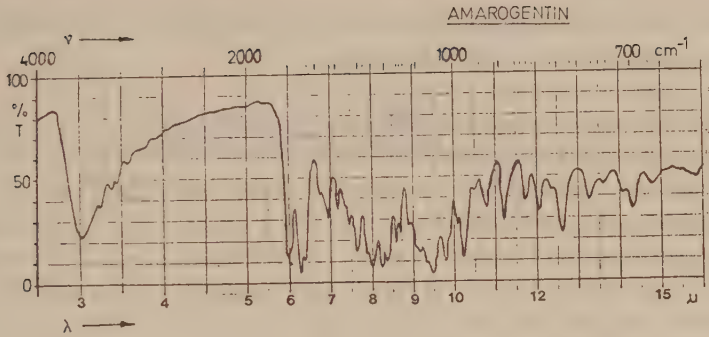


Abb. 5

IR-Spektren von Amarogentin, Amaropanin und Amaroswerin

In der Abb. 5 (S. 41) sind die IR-Spektren der drei genannten phenolischen Bitterstoffe Amarogentin, Amaropanin und Amaroswerin aufgezeichnet.

Weitere Aufklärung brachte das NMR-Spektrum. Wir verglichen auch hier die Spektren von Amaropanin und Amarogentin miteinander. Sämtliche aus dem iridoiden Geninteil und dem Zuckerteil stammenden Signale waren identisch. Charakteristisch war das Signal des H-3, das ebenso wie bei Amarogentin als Dublett $\delta = 7,33; J=2$ Hz erscheint, außerdem die Protonen am C-5 und C-9, deren Signale bei $\delta = 2,8 - 2,6$ erscheinen. Hieraus war abzuleiten, daß auch hier ein Swerosid-Grundkörper vorliegt. Auch die Verknüpfungsstellen des Zuckers müssen denen des Amarogentins entsprechen, wie aus den Signalen von H-1' (d), $\delta = 4,34$ und H-2' (t) $\delta = 4,8$, mit den Kupplungskonstanten von je 8 Hz, hervor geht.

Der einzige Unterschied ist im Aromatenbereich zu finden. Die bei Amarogentin als Dublett erscheinenden Signale von H-4" und H-6" ($\delta = 6,31$ und $\delta = 6,16$) sind bei Amaropanin zu tiefem Feld verschoben und fallen mit den Signalen von H-2" 4" und 6" in ein Multiplett zusammen. Das H-5"-Signal zeigt bei beiden Verbindungen die gleiche Lage ($\delta = 7,2$ (t) $J = 8$ Hz).

Zusätzlich ist bei Amaropanin ein Triplet bei $\delta = 7,42$ mit $J=8$ Hz vorhanden. Diese Signale wurden dem Proton C-5" zugeordnet. Bei Amarogentin treten im tieferen Feld durch die phenolischen OH-Protonen drei breite Singulette auf: OH-3" $\delta = 8,28$; OH-5" $\delta = 9,2$ und das chelatisierte Proton an OH-3" bei $\delta = 11,72$. Im Gegensatz dazu werden bei Amaropanin in diesem Bereich nur zwei OH-Protonen integriert: OH-3" bei $\delta = 8,26$ und OH-3" bei $\delta = 11,23$. Das OH-Signal am C-5" fehlt, dafür ist das oben angegebene Triplet zu finden.

Aus diesen Daten war für das Amaropanin ein Dihydroxydiphenylcarbonsäureester des Swerosids, also ein Desoxyamarogentin abzuleiten.

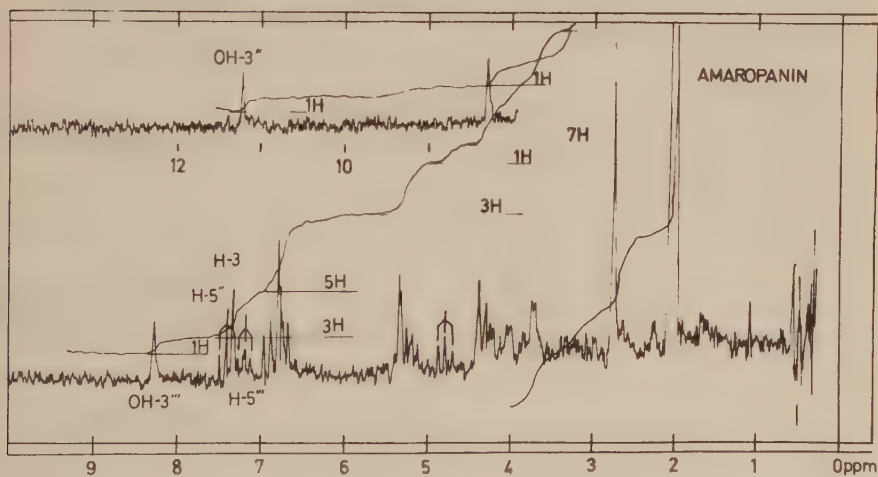
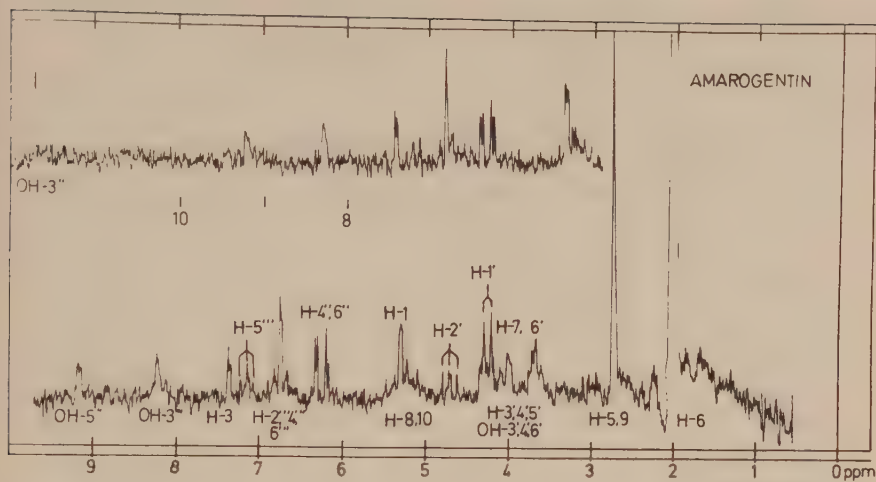


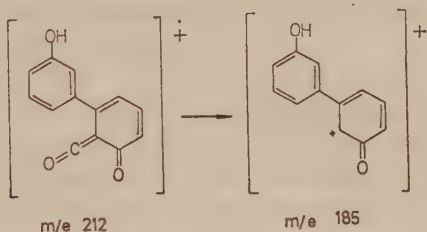
Abb. 6

NMR-Spektren von Amarogentin und Amaropanin

Tabelle 3: NMR-Spektraldaten von Amarogentin und Amaropandin
(δ in ppm, 100 MHz, Aceton d_6)

Protonen	δ ; ppm	
	Amarogentin	Amaropandin
CH ₂ -6	1,6 - 1,93 m	1,55 - 1,9 m
CH-5 } CH-9 }	2,57 - 2,82 m	2,6 - 2,8 m
CH ₂ -6'	3,8 m	3,64 - 3,68 m
CH ₂ -7	3,98 - 4,4 m	3,9 - 4,3 m
CH-3',4',5' } OH-3',4',5' }	2,9 - 4,3 m	2,9 - 4,2 m
H-1'	4,28 (J=8 Hz) d	4,34 (J=8 Hz) d
H-2'	4,72 (J= 8Hz) t	4,8 (J=8 Hz) t
CH-1	5,3 (J=1,5Hz) d	5,32 (J=1,5 Hz) d
CH-8 } CH-10 }	5,1 - 5,4 m	5,1 - 5,3 m
CH-6''	6,22 (J=2,5Hz) d	6,66 - 6,96 m
CH-4''	6,35 (J=2,5Hz) d	
CH-2''' , 4''' , 6'''	6,8 m	
CH-5'''	7,2 (J= 8Hz) t	7,2 (J= 8 Hz) t
CH-3	7,4 (J= 2Hz) d	7,33 (J= 2Hz) d
OH-3'''	8,28 s	8,27 s
OH-5''	9,2 s	- CH-5'' : 7,42 (J=8Hz)
OH-3''	11,72 s	11,23 s

Als weiterer Beweis für die Struktur konnten die aufgenommenen Massenspektren dienen. (Abb. 7, 8). Das Amaropanin lieferte keinen Massenpeak. Der base peak war bei m/e 212, entsprechend dem Phenolcarbonsäure-Bruchstück. Durch Abspaltung von $C=O$ (-28) kam der nächst größere peak zustande: m/e 186.



Zum Vergleich mit Amarogentin wurden von den Permethyl-äthern der beiden Substanzen Massenspektren aufgenommen. Auch hier wurden keine Molekülionen registriert. Die Fragmentierung erfolgte wie oben an der Diphenylcarbonsäure-esterbindung.

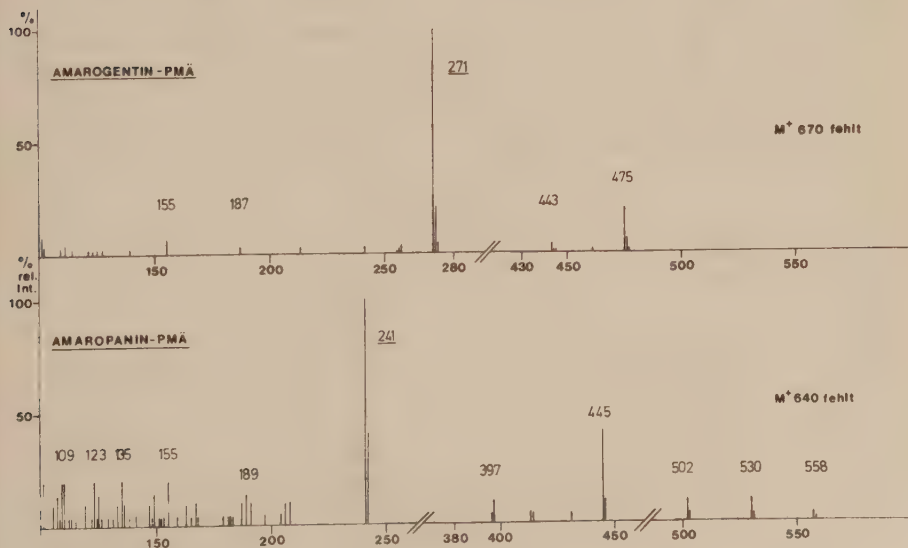
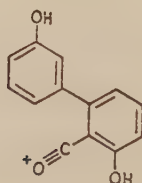


Abb. 7 Massenspektrum der Permethyläther der Ritterstoffe

Der base peak entsprach dem methylierten Tri- bzw. Dihydroxy-diphenyl-carbonsäure-Teil, bei Amarogentin $m/e = 271$ und bei Amaropandin $m/e = 241$. Der Massenunterschied von genau 30 entsprach der Masse einer methylierten OH-Gruppe. Auch das Fragment, bei dem nur der Secoiridoidteil vom Molekül abgespalten wurde, zeigte den Unterschied von 30 ME (m/e 475 bei Amarogentin und m/e 445 bei Amaropandin).

Im MS des Amaropandinperacetates fanden wir den gesuchten Molekülpeak bei m/e 780, womit das Molekulargewicht unseres Stoffes mit 570 bestätigt war. In diesem Spektrum ließ sich der Abbau des Moleküls gut verfolgen. Auch hier entsprach der base peak m/e 213 dem Diphenylcarbonsäurebruchstück. Während der Iridoidgrundkörper als Ganzes abgespalten worden war, wurde der acetylierte Glucose+Diphenyl-carbonsäureesterrest stufenweise abgebaut. Die Abspaltung von 5 Acetylgruppen erfolgte in 2 Stufen: vom Phenolteil wurden zweimal 42 ME und vom Zuckerteil dreimal 60 ME abgespalten (s.S. 48).



213

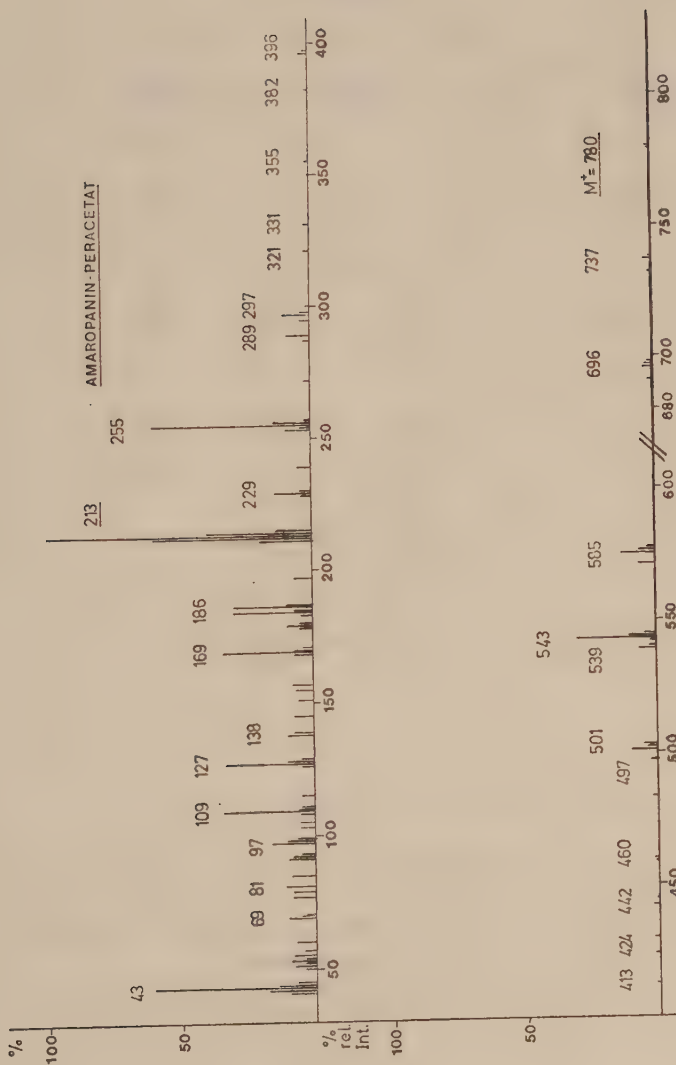


Abb. 8: Massenspektrum des Amaropanin-peracetates

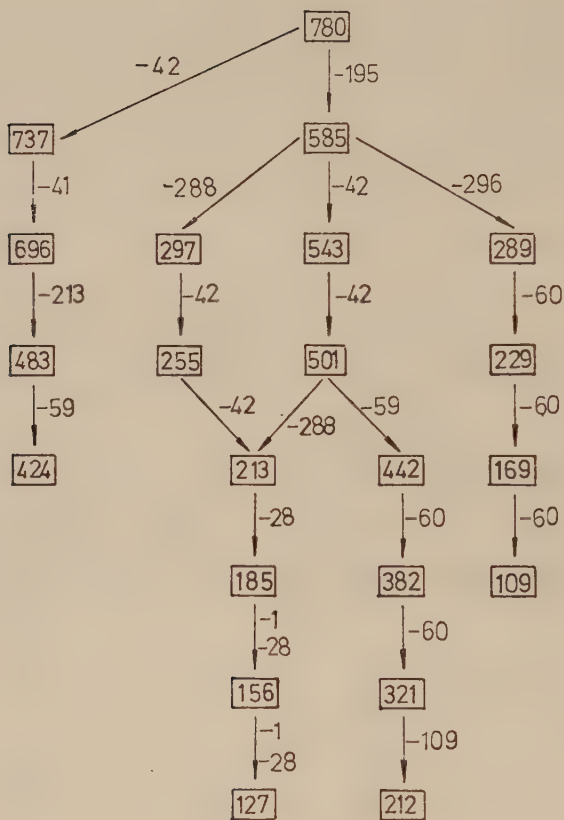


Abb. 9

Zerfallsschema des Amaropropaninperacetates

Um mehr über die Stereochemie zu erfahren, wurden Circular-dichrogramme (CD-Kurven s.S. 49) von Amarogentin und Amaropropanin aufgenommen und miteinander verglichen. Amarogentin gelöst in Acetonitril gab folgende Werte:

309 nm ($\Delta \epsilon + 1,40$); 265 nm ($\Delta \epsilon - 9,89$); 241 nm ($\Delta \epsilon + 10,51$)

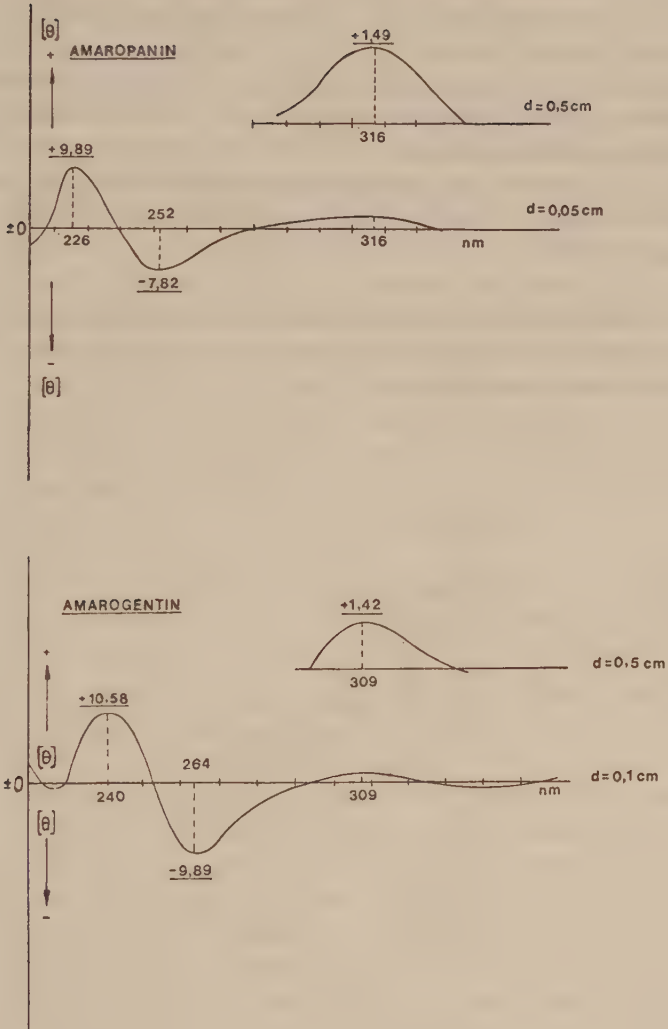


Abb. 10

CD-Kurven von Amarogentin und Amaropandin

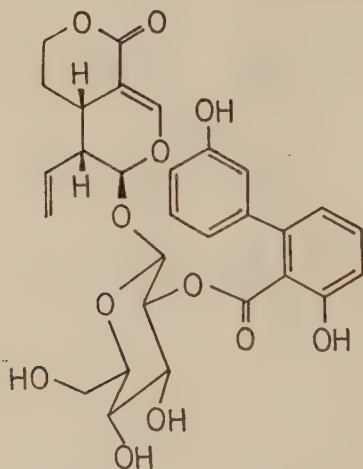
Amaropandin (Acetonitril) lieferte folgende Daten:

317 nm ($\Delta \epsilon + 1,49$); 252 ($\Delta \epsilon - 7,96$); 226 ($\Delta \epsilon + 9,89$)

Die beiden Kurven entsprechen sich in der Form sehr gut.

Die Banden bei 252 und 226 nm liegen bei Amaropandin kurzwelliger. Die Verschiebung wird durch die unterschiedliche Substitution im aromatischen Teil erklärt. Aus dem Vergleich der Spektren kann daher geschlossen werden, daß beide Verbindungen im chiralen Teil die gleiche Konfiguration besitzen.

Für das Amaropandin schlagen wir daher die Struktur eines 3, 3'-Dihydroxydiphenylcarbonsäureesters des Swerosids oder Desoxyamarogentins vor.



AMAROPANIN

4.0 QUANTITATIVE ANALYSE

4.1 Bisherige Methode

Die einzige bisher existierende Methode der Wertbestimmung für Bitterstoffdrogen ist die sensorische Geschmacksprüfung. Sie ist mit Abwandlungen in den verschiedenen Arzneibüchern anzutreffen. Sie besteht darin, daß man innerhalb von zwei Verdünnungsreihen diejenige Lösung ermittelt, die vom Prüfer eben noch als bitter empfunden wird. Die erste Versuchsreihe wird mit einer Standardsubstanzlösung mit festgelegtem Bitterwert durchgeführt (Brucin, Chinin). Sie dient der Feststellung des persönlichen Korrekturfaktors, d.h. der Empfindlichkeit des Prüfers gegenüber dem Geschmack "bitter". Die zweite Versuchsreihe wird mit dem zu bestimmenden Drogenauszug durchgeführt. Beide Tests sind ohne Zeitunterbrechung hintereinander durchzuführen.

Die Schwierigkeiten und Ungenauigkeiten, die diesen Methoden anhaften, können von den drei mitbeteiligten Komponenten: Droge, Lösungsmittel und Mensch verursacht sein.

Eine objektive Beurteilung kann z.B. durch Vorhandensein von Begleitstoffen, wie z.B. Gerbstoffen und ätherischen Ölen, die eine Geschmacksmaskierung hervorrufen, erschwert werden. Die Löslichkeit der Bitterstoffe in Wasser spielt ebenfalls eine Rolle, da wässrige Auszüge geprüft werden. Auch das Lösungsmittel hat einen großen Einfluß auf die Geschmacksempfindung der Versuchspersonen (72). Normalerweise wird Trinkwasser verwendet, da es der Mensch als geschmacklos empfindet. Wie verschiedene Autoren (72, 73) berichten, wird aber durch Leitungswasser eine weite Streuung der Schwellenwerte verursacht und die Erkennung einer eindeutigen Grenzkonzentration erschwert. Sie bevorzugen daher bidestilliertes Wasser, das einen etwas "bitteren" Grundgeschmack hat, woran sich der Prüfer gewöhnen muß. Manche Autoren verwenden demineralisiertes Wasser, das einen "süßlichen" Geschmack aufweist. Auch hieran muß man

sich gewöhnen.

Die größte Fehlerquelle stellt die Testperson selbst dar, deren Geschmacksempfindung als "Meßinstrument" dient. Manche Personen sind absolut ungeeignet. Sie gelten als "geschmacksblind". Außerdem kann man auch zeitweilig, z.B. bei Stress-Situationen, während der Schwangerschaft, bei Infekten des Rachenraumes oder nach Medikationen mit Schilddrüsenpräparaten, außerstande sein, eine organoleptische Bestimmung durchzuführen. Raucher haben prinzipiell ein gestörtes Geschmacksempfinden. Auch die gegenseitige Beeinflussung von Versuchspersonen, die in einer Gruppe arbeiten, ist nicht zu unterschätzen. Ein genauer Bitterwert gilt nur dann bestimmt, wenn eine geübte Testgruppe von 10 - 20 Personen die Bestimmung über einen Zeitraum von 3 Wochen 1 - 2 mal wöchentlich durchführt. Auf anderem Wege ermittelte Werte stellen nur ungefähre Schwellenwerte dar. Für Radix Gentianae bestimmte KÄMPF (74) in einer Versuchsreihe mit 23 Personen den Bitterwert und die Streuung. Die Standardabweichung vom Mittelwert betrug 86 Ph. Helv.-Einheiten, wobei für Radix Gentianae ein Bitterwert von 200 Ph. Helv. Einheiten vorgeschrieben ist. Das entspricht einer relativen Standardabweichung vom Mittelwert von $\pm 24 \%$. Da die organoleptische Bestimmungsmethode mit großem Zeitaufwand verbunden ist, und immer nur Werte liefert, die von der subjektiven Empfindung und Entscheidung abhängen und nur durch Bildung eines statistischen Mittelwertes vieler Bestimmungen von verschiedenen Personen einigermaßen verbindlich sind, war eine exakte chemische Gehaltsbestimmung wünschenswert. Erst mit Hilfe einer solchen Bestimmung wäre es auch möglich, die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe in Abhängigkeit von Bodenbeschaffenheit, Klima und Lagerung und biosynthetischen Zusammenhängen exakt zu studieren.

4.2 Aufgabenstellung

Bedingung für eine Wertbestimmungsmethode, die die organoleptische Bestimmung ersetzen kann, ist die Erfassung sämtlicher, bitter schmeckender Komponenten. Da aber die Bitter-

wirkung der einzelnen Bitterstoffe stark variiert (s.Tab.4), ist eine chemische Methode nur dann brauchbar, wenn jede Substanz getrennt bestimmt werden kann. Die infrage kommenden Stoffe und ihre Bitterwerte sind in der folgenden Tabelle 4 zusammengefaßt. Die Bitterwerte für Amarogentin, Gentiopikrosid und Gentiobiose sind von KORTE (10) angegeben. Die von Amaroswerin und Amaropanin bestimmten wir nach dem ÖAB 9.

Tabelle 4: Bitterwerte der Enzianbitterstoffe

Bitterstoff	Bitterwert	ca. %-Gehalt in Wurzel
Amarogentin	58 000 000	0,05 - 0,25
Amaroswerin	58 000 000	0,05
Amaropanin	20 000 000	0,05 - 0,15
Gentiopikrosid	12 000	3 - 8
Gentiobiose	120	8 - 10

Obwohl die ersten drei Bitterstoffe der Tabelle nur in geringer Konzentration in der Droge enthalten sind, liefern sie den Hauptanteil an Bitterwirkung. Zur Veranschaulichung sollen folgende Zahlen dienen: 4830 µg Gentiopikrosid besitzen die gleiche Bitterwirkung wie 1 µg Amarogentin, was einem Verhältnis von 1 : 5 000 entspricht. Prozentual gesehen ist Gentiopikrosid zu 0,8 % am Gesamtbitterwert beteiligt.

Die Bitterwirkung der Gentiobiose ist aber so gering, daß sie zu vernachlässigen ist.

Wir konzentrierten uns daher auf die quantitative Bestimmung der phenolischen Bitterstoffe.

Bei Gentiana lutea z.B. sind nur die Bitterstoffe Amarogentin und Gentiopikrosid anzutreffen. Im Durchschnitt sind in

dieser Droge 2 % Gentiopikrosid und 0,05 % Amarogentin enthalten.

Wenn man mit Hilfe der Bitterwerte der Reinstoffe den theoretisch zu erwartenden Bitterwert der Droge errechnen will, ergibt sich folgendes (Bitterwerte werden auf 1 g Droge bezogen): 1 g dieser Droge enthielten demnach 20 mg Gentiopikrosid und 0,5 mg Amarogentin.

20 mg Gentiopikrosid liefern somit einen Bitterwert von 240, während 0,5 mg Amarogentin einen Bitterwert von 29 000 ergeben. Dies würde bedeuten, daß die Droge einen Bitterwert von 29 240 haben muß, wobei die Zahl 29 000 durch den Gehalt an Amarogentin und 240 durch Gentiopikrosid geliefert wird. Der mittlere Fehler beträgt dann nur ca. 1 %.

Das Beispiel zeigt, in welchem geringem Maße Gentiopikrosid an dem Gesamtbitterwert beteiligt ist. Um überschlagsweise den Bitterwert zu erhalten, genügt es demnach, wenn man nur den Gehalt an Amarogentin bestimmt. Die Bestimmungsmethode muß aber so empfindlich sein, daß sie die phenolischen Bitterstoffe noch im µg-Bereich erfaßt.

Zunächst waren wir bestrebt, eine einzige chemische Methode zu finden, mit der alle Bitterstoffe bestimmt werden konnten. Dies schien möglich, da alle Bitterstoffe als gemeinsame chemische Merkmale eine Lactongruppierung und Zucker enthalten.

Zur Bestimmung des Zuckeranteils bot sich die Anthron-Methode (68, 75) an. Es zeigte sich jedoch, daß die Bestimmung von Amarogentin auf diesem Wege große Schwierigkeiten bereitete. Erstens war kein eindeutiges Maximum bei 620 nm zu erhalten und zweitens entstanden durch Zugabe der konzentrierten Schwefelsäure braungefärbte Nebenprodukte, die die photometrische Bestimmung störten. Das Verfahren war aber gut geeignet für die Gehaltsbestimmung des Gentiopikrosids.

Der Versuch, die Lactongruppierung zur Bestimmung heranzuziehen, etwa mit Hilfe des Hydroxamsäure/Fe-Komplexes (76), schlug fehl, da die Hydroxambildung nicht quantitativ erfolgte. Auch eine vorausgegangene Acetylierung der OH-Gruppenführte zu keinem Ergebnis.

Die gaschromatographische Methode (77), durchgeführt auf einer SE-30-Säule, mit den silylierten Bitterstoffen, eignete sich nur für Gentiopikrosid. Bei Amarogentin waren nur noch Bruchteile der aufgegebenen Menge bei langer Retentionszeit im Eluat zu finden.

Da eine gemeinsame Bestimmungsmethode für Gentiopikrosid und die phenolischen Bitterstoffe zu finden Schwierigkeiten bereitet und Gentiopikrosid praktisch vernachlässigt werden kann, suchten wir in erster Linie eine Methode für die Bestimmung der phenolischen Bitterstoffe.

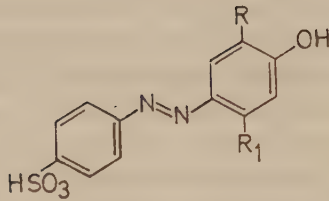
Für die Bestimmung der phenolischen Bitterstoffe standen mehrere Möglichkeiten zur Wahl:

Die Umsetzung der Phenole mit 4-Methoxy-2-Nitroanilin, mit 4-Aminoantipyrin oder mit diazotierter Sulfanilsäure.

Die erste Methode gab für Amarogentin gute Ergebnisse, war aber für Amaropanin nicht brauchbar, da keine Diazotierung stattfand. Die zweite Methode war mit einer Erfassungsgrenze von ca. 100 µg zu wenig empfindlich.

Wir entschieden uns für die Bestimmungsmethode mit diazotierter Sulfanilsäure (78), wobei wir die Modifikation nach VACEK und TYROLOVA (79, 80) wählten.

Phenole geben bei Zusatz von diazotierter Sulfanilsäure im alkalischen Milieu durch Bildung von Azofarbstoffen eine beständige Gelbfärbung. Normalerweise erfolgt die Kupplung in para-Stellung zu der OH-Gruppe. Ist diese besetzt, kann auch in ortho-Stellung gekuppelt werden.



Da die Acylbitterstoffe mehrere in para-Stellung freie phenolische OH-Gruppen besitzen, konnte diese Reaktion durchgeführt werden.

4.3. Gehaltsbestimmung der phenolischen Bitterstoffe mit diazotierter Sulfanilsäure

Die Methode war für alle phenolischen Bitterstoffe empfindlich genug. Schon 10 µg Substanz gaben Extinktionswerte, die über 0,1 lagen. Außerdem war die Methode gut reproduzierbar und unkompliziert.

Verständlicherweise eignete sich die Methode wegen der störenden Begleitstoffe nicht für eine Direktbestimmung aus Drogenextrakten. Hier hat in jedem Fall eine dünnschichtchromatographische Auftrennung der Bitterstoffe vorauszu-gehen. Nur die so aus der Platte durch Elution gewonnenen "Reinstoffe" können für die Bestimmung eingesetzt werden.

Eine chemische Wertbestimmung der Enzian-Droge beinhaltet somit folgende Teilschritte: Extraktion der Inhaltsstoffe, dünnschichtchromatographische Auftrennung der Bitterstoffe, Umsetzung der der Platte entnommenen Einzelsubstanzen mit diazotierter Sulfanilsäure und photometrische Bestimmung.

4.3.1 Extraktion nach DC der Bitterstoffe

Die Extraktion der Inhaltsstoffe erfolgte wie auf Seite 18 für DC beschrieben mit Methanol, wobei die quantitative Isolierung Voraussetzung für eine genaue Gehaltsbestimmung

ist. In 10 ml Endlösung muß die gesamte, extrahierbare Menge an Bitterstoffen aus 2 g Droge enthalten sein. Ein aliquoter Teil dieser Lösung wird für die DC-Trennung verwendet. Die Durchführung der Chromatographie erfolgt wie im Kap.2.2(S.19) beschrieben. Die DC-Platten werden nach Entfernen des Fließmittels bei UV-Licht 254 nm betrachtet. Die durch Fluoreszenzminderung sichtbaren Bitterstoffzonen werden markiert.

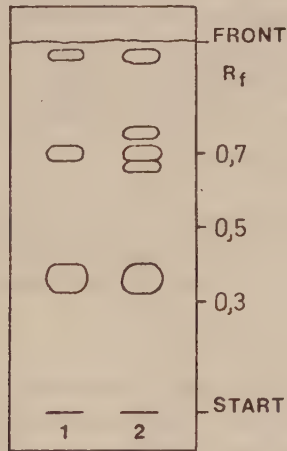


Abb.: 11 DC-Schema für *Gentiana lutea* (1) und den
Enzianarten mit mehreren phenolischen Bitterstoffen (2)

Nach dem Chromatogrammbild ist zu entscheiden, ob die vorliegende Droge an phenolischen Bitterstoffen nur Amarogentin, wie bei *Gentiana lutea* oder Amarogentin und Amaropinin, die Bitterstoffe aus *Gentiana pannonica*, *purpurea* und *punctata*, enthält. Amaroswerin ist von untergeordneter Bedeutung, da es in größeren Konzentrationen nur selten vorkommt. Die üblichen Konzentrationen sind so gering, daß eine chromatographische Abtrennung von Amarogentin nur schwer gelingt. Oft ist nur eine Schwanzbildung des Amarogentinflecks zu beobachten.

Eine Trennung zwischen Amarogentin und Amaroswerin ist aber für die quantitative Bestimmung nicht nötig, da beide Bitterstoffe sowohl gleiche Bitterwerte besitzen als auch den gleichen Phenolrest im Molekül aufweisen und damit gleiche Diazotierungsprodukte liefern. Außerdem kommt Amaroswerin nur in Begleitung von Amarogentin vor. Sie werden immer gemeinsam bestimmt.

Amaropinin unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von Amarogentin. Einmal ist der Bitterwert viel niedriger (s. Tab. 4), zum zweiten besitzt es im aromatischen Teil des Moleküls eine OH-Gruppe weniger. Es ist daher anzunehmen, daß andere Reaktionsprodukte mit diazotierter Sulfanilsäure entstehen.

Für die Gehaltsbestimmung sind somit in der Praxis zwei Möglichkeiten gegeben. Im ersten Fall, wenn reine Gentiana lutea-Droge vorliegt, ist nur der Gehalt an Amarogentin zu bestimmen.

Im zweiten Fall, wenn außer Amarogentin, das in allen offiziellen Enzianarten vorkommt, auch Amaropinin enthalten ist (Amaropinin-haltige Enzianarten oder Drogengemisch), ist eine getrennte Bestimmung von Amarogentin bzw. Amaroswerin und Amaropinin notwendig.

Nach der Chromatographie werden die den Bitterstoffen entsprechenden Kieselgelzonen vorsichtig abgeschabt und mit Methanol p.a. extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren des Kieselgels wird ein aliquoter Teil der überstehenden Lösung für die Analyse entnommen.

4.3.2 Umsetzung mit diazotierter Sulfanilsäure

Als Reagens werden eine 1 %ige salzsaure Lösung von Sulfanilsäure und eine 5 %ige Lösung von Natrium-nitrit zugesetzt. Nach 15 Minuten Wartezeit bei Zimmertemperatur wird

mit 2o %iger Natrium-Carbonatlösung alkalisiert und die Extinktion bei 470 nm im Spektralphotometer gemessen.

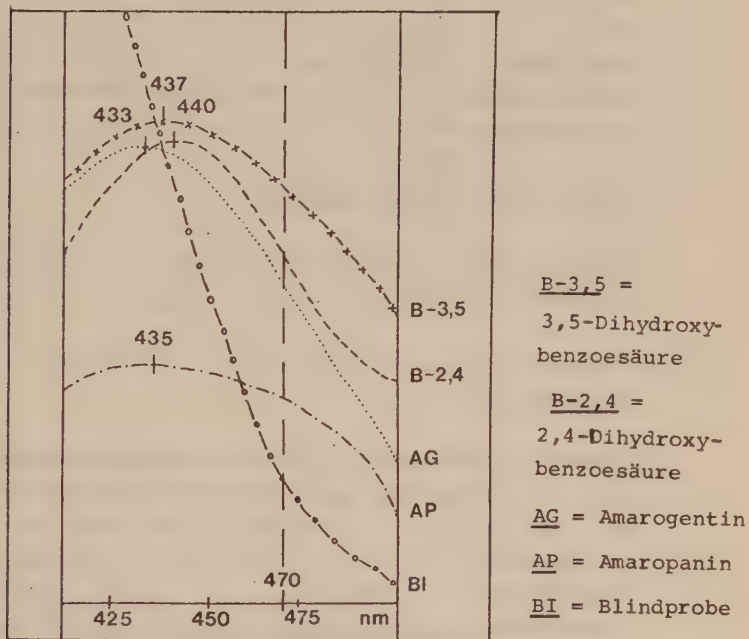


Abb. 12: Maxima der Reaktionsprodukte der Bitterstoffe mit diazotierter Sulfanilsäure

Die Maxima der Reaktionsprodukte liegen je nach Substanz zwischen 430 und 440 nm. Die Tatsache, daß nicht bei den Maxima, sondern bei 470 nm gemessen wird, hat folgenden Grund:

Die gegen Methanol gemessene Extinktion der Referenzlösung (bestehend aus dem verwendeten Lösungsmittel und der Reagenzlösungen) steigt, wie in der Skizze (Abb. 12) dargestellt, in Richtung zu kürzeren Wellenlängen an. Sie erreicht bei 440 nm eine Extinktion von 0,5.

Die Werte bei 470 nm lagen auf einer genau reproduzierbaren Gerade, während die bei 440 nm gemessenen Extinktionen sprunghafte Abweichungen von der Gerade ergaben.

4.3.3 Aufstellung einer Eichgerade

Für die Aufstellung der Eichgeraden verwendeten wir die auf Seite 37 isolierten Reinsubstanzen.

4.3.3.1 Am Beispiel des Amarogentins wird die Aufstellung der Eichgerade erläutert.

1,0 mg kristallisiertes Amarogentin wurde in 10,0 ml Methanol p.a. gelöst. Abgestufte Volumina dieser Lösung wurden für die Analyse entnommen und mit Methanol auf 2,0 ml aufgefüllt. Nach Zugabe der Reagenzlösung wurde, wie auf Seite 58 beschrieben, weiterbehandelt.

Die gefundenen Extinktionen bei 470 nm sind in der Tabelle 5 wiedergegeben. Die sich daraus ergebende Eichgerade ist im Diagramm (Abb. 13) aufgezeichnet. Für den Quotient "m" ($m = E/mg$) wurde eine Fehlerrechnung durchgeführt.

$$m = \frac{\text{Extinktion}}{\text{mg Substanz}}$$

a) Tabelle 5: Amarogentin 1,0 mg in 10,0 ml Methanol

ml	µg AG	E 470 nm	'm'
0,1	10	0,066	6,6
0,2	20	0,126	6,3
0,3	30	0,194	6,55
0,3	30	0,195	6,4
0,4	40	0,262	6,3
0,4	40	0,258	6,4
0,45	45	0,286	6,35
0,5	50	0,317	6,4
0,5	50	0,324	6,5
0,6	60	0,39	6,5
			$\bar{\phi} = 6,43$

Für Amarogentin-Testlösung ergab sich nach dem Olivetti-Computer-Programm folgende Fehlerrechnung:

<u>Mittelwert von 'm':</u>	$M = 6,43$
<u>Standardabweichung:</u>	$S = 0,103$
<u>Mittlerer Fehler der Standardabweichung:</u>	$S_S = 0,023$
<u>Variabilitätskoeffizient:</u>	$V = \pm 1,60 \%$
<u>Schätzwert für den mittleren Fehler des</u>	
<u>Variabilitätskoeffizienten:</u>	$S_V = \pm 0,36\%$

Eine relative Standardabweichung (bzw. der Variabilitätskoeffizient) von $\pm 1,60 \%$ bedeutet bei der quantitativen Bestimmung von Naturstoffen eine gute Reproduzierbarkeit.

Für Amaroswerin wurde keine gesonderte Eichgerade aufgestellt, da die Analyseergebnisse eine mit der Amarogentin-Eichgerade identische Linie ergaben.

4.3.3.2 Die Eichgerade von Amaroparin, die auf die gleiche Weise aufgestellt wurde, verläuft tiefer, als es aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte von Amarogentin und Amaroparin zu erwarten gewesen wäre.

Daher ist bei einer Droge, die neben Amarogentin auch Amaroparin enthält, für Amaroparin in jedem Falle eine gesonderte Bestimmung notwendig.

Zur Aufstellung der Eichgerade wurden auch hier 1,2 mg kristallisiertes Amaroparin in 10 ml Methanol p.a. gelöst und auf die gleiche Weise wie bei Amarogentin beschrieben bestimmt. Die gefundenen Extinktionswerte und die dazugehörige Fehlerrechnung sind im folgenden aufgeführt. Die Eichgerade ist auf Seite 63 abgebildet.

b) Tabelle 6: Amaroparin 1,2 mg in 10,0 ml Methanol

μg	E 470 nm	"m"
12	0,053	4,4
24	0,111	4,6
24	0,110	4,6
33	0,152	4,6
37	0,168	4,55
42	0,20	4,7
55	0,250	4,5
60	0,281	4,7
62	0,275	4,45
74	0,336	4,45
$\bar{\phi} =$		4,555

Fehlerrechnung:

Mittelwert von "m":

$$M = 4,555$$

Standardabweichung:

$$S = 0,1039$$

Mittlerer Fehler der Standardabweichung:

$$S_s = 0,023$$

Variabilitätskoeffizient:

$$V = \pm 2,28 \%$$

Schätzwert für den mittleren Fehler des

Variabilitätskoeffizienten:

$$S_V = \pm 0,051 \%$$

Die etwas größere Standardabweichung bei Amaropanin erklärt sich aus dem abgeflachten Verlauf der Amaropaninkurve, die kein eindeutiges Maximum zeigt. Da aber trotzdem eine gute Reproduzierbarkeit gegeben ist, die relative Standardabweichung nur $\pm 2,28 \%$ beträgt und die gemessenen Extinktionen in den üblichen Konzentrationsbereichen das Lambert-Beer'sche-Gesetz erfüllen, ist die Bestimmungsmethode auch für Amaropanin gut geeignet.

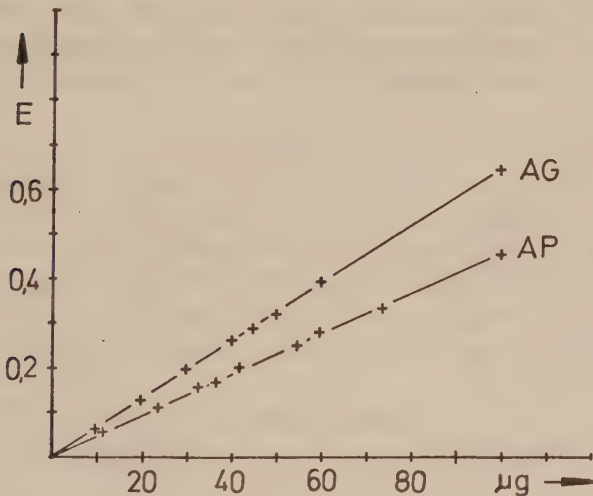


Abb. 13: Eichgeraden von Amarogentin (AG) und Amaropanin (AP)-Testlösungen

4.3.4 Vergleich der molaren Extinktionen

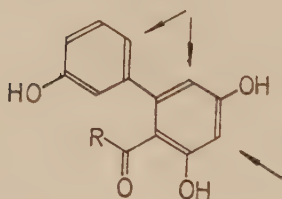
Um eine Erklärung für den von einander abweichenden Verlauf der Eichgeraden von Amarogentin und Amaropanin zu finden, berechneten wir die molaren Extinktionen.

Das Molekulargewicht des Amarogentins (mit 1 Mol Kristallwasser berechnet) beträgt 604, für Amaropanin 570.

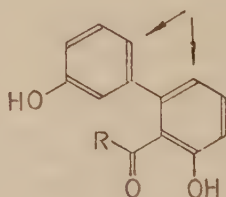
Um im μg -Bereich zu bleiben, wurden die Extinktionen für 0,1 μmol , entsprechend 60,4 μg Amarogentin oder 57 μg Amaropanin, bestimmt. Die Extinktion betrug bei Amarogentin 0,39, bei Amaropanin 0,26.

Daraus folgt ein Extinktionsverhältnis von 3 : 2. Dies entspricht der Zahl von möglichen Kupplungen mit diazotierter Sulfanilsäure.

Bei Amaropanin kann an zwei Stellen (6'', 6'''), jeweils in para-Stellung zu einer OH-Gruppe, gekuppelt werden. Bei Amarogentin wird außer an diesen Stellungen auch am C-4'' durch den doppelten ortho-Effekt eine dritte Kupplung induziert. Pro Kupplung und pro 0,1 μmol errechnet sich ein Extinktionswert von 0,13.



Amarogentin



Amaropanin

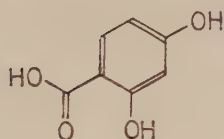
Die Pfeile zeigen die möglichen Kupplungsstellen an.

4.3.5 Bezugssubstanz

Da für die Intensität des gebildeten Farbstoffes mit diazotierter Sulfanilsäure nur der Phenolteil des Moleküls verantwortlich ist, suchten wir nach ähnlichen, aber einfacher gebauten und leichter zugänglichen Phenolen, die als Bezugssubstanz eingesetzt werden konnten.

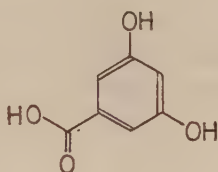
Wir untersuchten die drei im Handel erhältlichen Phenole:

- | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|
| a) 2,4 Dihydroxybenzoesäure | (B - 2,4) | (MG: 154) |
| b) 3,5 Dihydroxybenzoesäure | (B - 3,5) | (MG: 154) |
| c) 2,2' Biphenyldiol | (BP- 2,2) | (MG: 204) |



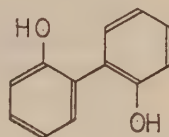
a)

2,4-Dihydroxybenzoe-
säure



b)

3,5-Dihydroxybenzoe-
säure



c)

2,2'-Biphenyl-
diol

Die Substanzen wurden vor der Durchführung der Analyse aus Äthanol p.a. umkristallisiert. Nach Trocknung wurden 4 mg entnommen und in 100 ml Methanol p.a. gelöst. Diese Lösungen wurden in Versuchsreihen, wie bei Amarogentin beschrieben, mit Diazotierungsreagenz umgesetzt. Ihre Extinktionen wurden bei 470 nm gemessen, obwohl auch hier die Maxima wie bei den Bitterstoffen zwischen 435 und 440 nm lagen.

Folgende Ergebnisse wurden gefunden:

0,1 μmol (entsprechend 15,4 μg) B-3,5 gaben eine Extinktion von 0,39.

0,1 μmol ($\approx$ 15,4 μg) B-2,4 und 0,1 μmol ($\approx$ 20,4 μg) BP-2,2 gaben die Extinktion 0,26.

Aus den molaren Extinktionen läßt sich auch hier der Grundwert von 0,13 für die Extinktion von 0,1 μmol Phenol, pro Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure, berechnen.

B-3,5 hat drei Kupplungsstellen frei, während B-2,4 und BP-2,2 je zwei Anlagerungen erlauben. Bei unseren Versuchsreihen mußten wir aber feststellen, daß B-3,5 und BP-2,2 empfindlicher auf störende Einflüsse reagierten und eine größere Streuung in ihren Extinktionswerten aufwiesen als B-2,4.

Da hier auch die strukturelle Ähnlichkeit mit dem Phenolteil der Bitterstoffmoleküle am größten war, wählten wir B-2,4 als Bezugssubstanz.

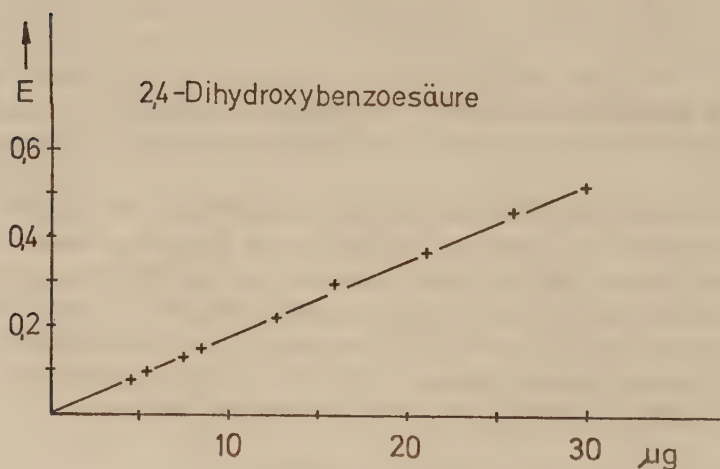


Abb. 14: Eichgerade der Bezugssubstanz B-2,4

Für B-2,4 wurde eine Eichgerade aufgestellt (Abb. 14). Die ermittelten Extinktionen sind in der Tabelle 7 zusammengefaßt. Die folgende Fehlerrechnung zeigt die gute Reproduzierbarkeit für die Bezugssubstanz.

Tabelle 7: 2,4 Dihydroxybenzoesäure 4,0 mg in 100 ml
Methanol

μg	E 470	m
4,55	0,078	17,1
5,4	0,091	16,9
7,5	0,126	16,8
8,5	0,146	17,2
12,75	0,219	17,2
17,0	0,293	17,2
21,3	0,369	17,3
21,6	0,369	17,1
27,0	0,458	17,0
29,9	0,512	17,1
$\bar{\phi} =$		17,09

Fehlerrechnung für "m":

Mittelwert von "m": $M = 17,09$
Standardabweichung: $S = 0,1524$

Mittlerer Fehler der Standard-
abweichung: $S_s = 0,034$
Variabilitätsfaktor: $V = \pm 0,89 \%$
Schätzwert des mittleren Fehlers
des Variabilitätsfaktors: $S_v = \pm 0,199 \%$

4.3.6 Die molaren Eichgeraden

In Abb. 15 ist die Eichgerade der molaren Extinktionen von Amarogentin, Amaroswerin, Amaropandin und B-2,4 wiedergegeben.

Für jeweils 0,1 μmol dieser Stoffe wurden folgende Extinktionen gefunden:

E für 0,1 μ mol

AG	(= 60,4 μ g)	E = 0,39
AS	(= 62,2 μ g)	E = 0,39
AP	(= 57 μ g)	E = 0,26
B-2,4	(= 15,4 μ g)	E = 0,26

In diesem Diagramm fallen die Geraden für Amarogentin und B-2,4 deckungsgleich zusammen, während Amaroswerin eine um 1/3 höher verlaufende Gerade bildet.

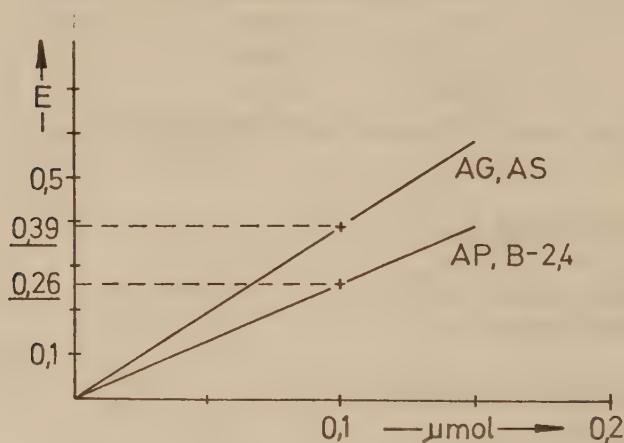


Abb. 15: Molare Eichgerade von Amarogentin (AG),
Amaroswerin (AS), Amaropanin (AP) und B-2,4

Diese Zahlen sind nicht als Absolutwerte zu betrachten, da sie je nach Durchführung und Apparatur schwanken können. Doch konnten wir feststellen, daß das Verhältnis der Extinktionswerte pro Anlagerung immer gleich bleibt und Abweichungen durch eine Parallelbestimmung mit B-2,4 ausgeglichen werden können. Als zusätzliche Kontrolle ist es von Nutzen, die Extinktion des Blindwertes gegen Luft bei jeder Bestimmung zu messen. Unsere Werte lagen bei 0,175 - 0,18. Größere Abweichungen sollten vermieden werden.

4.3.7 Die irreversible Adsorption am Kieselgel

Die bisher beschriebenen Versuchsreihen und Ergebnisse bezogen sich auf die Lösungen der Bitterstoffreinsubstanzen, die direkt, ohne vorherige DC-Trennung mit Reagenz versetzt wurden. Da der Bestimmung von Drogen-Extrakten eine Dünnschichtchromatographie vorausgeht, muß auch die partielle irreversible Adsorption der Bitterstoffe an das Kieselgel berücksichtigt werden.

Dazu wurden Stammlösungen bekannter Konzentration von den Bitterstoffen Amarogentin und Amaropinin und der Bezugssubstanz B-2,4 einem Parallelversuch unterworfen, wobei jeweils gleiche Volumina einmal direkt, einmal nach DC-Trennung auf Kieselgel-60-Platten für eine Gehaltsbestimmung verwendet wurden.

Es zeigte sich, daß der Verlust durch die Auftrennung auf der Platte bei allen untersuchten Substanzen (Amarogentin, Amaropinin, B-2,4) annähernd gleich war und ca. 7 % (+ 1 %) betrug.

Dies bedeutet, daß beim Arbeiten mit Drogen-Extrakten entweder diese 7 % bei jeder Messung zu berücksichtigen sind oder zum Vergleich immer eine Testlösung mitzuchromatographieren ist.

4.3.8 Auswertung

Steht Amarogentin zur Verfügung, wird es als Bezugssubstanz verwendet.

Dazu werden auf die DC-Platte neben den Probeextrakten auch eine oder zwei Bahnen gemessene Menge Amarogentinlösung aufgetragen. Die Konzentration des Amarogentins in der Testlösung muß in der gleichen Größenordnung liegen wie sie in der Droge anzutreffen ist. Es ist dann anzunehmen, daß auch der Verlust durch die Adsorption an Kieselgel in etwa gleich ist.

Die gefundenen Extinktionen können miteinander in Relation gesetzt werden. Da die Menge des eingesetzten Amarogentintests bekannt ist, kann man den Gehalt an Amarogentin in der auf DC aufgetragenen Menge Drogenextrakt berechnen.

Umrechnungsformel 1:

$$E_T : E_P = M_T : M_P$$

E = Extinktion
M = Menge
T = Testlösung
P = Probeextrakt

Anstelle von Amarogentin kann das im Handel erhältliche B-2,4 verwendet werden, da es auch in etwa die gleiche irreversible Adsorption an Kieselgel aufweist. Der Gehalt an Bitterstoff läßt sich somit aus dem Verhältnis der gefundenen Extinktionen von B-2,4 und gesuchtem Bitterstoff nach folgender Formel berechnen:

Umrechnungsformel 2:

$$G = \frac{E_P}{E_T} \cdot M \cdot K$$

G = Gehalt Bitterstoff in 10 ml Meßlösung

M = bekannte Menge B-2,4, die eingesetzt wurde in 10 ml Meßlösung

E_P = gemessene Extinktion der Bitterstofflösung

E_T = gemessene Extinktion der B-2,4 Lösung

K = konstanter Faktor, berechnet aus den Molekulargewichten

Bestimmt man die Extinktion einer Bitterstofflösung (E_P) unbekannter Konzentration und gleichzeitig die Extinktion einer B-2,4-Lösung (E_T) mit bekannter Konzentration (M), so läßt sich aus diesen Werten der Gehalt (G) des Bitterstoffes

in der eingesetzten Menge Probelösung berechnen. K stellt eine Konstante dar, die aus dem Verhältnis der Molekulargewichte berechnet wurde.

Berechnung der Konstante K

$$K = \frac{MG \text{ (Bitterstoff)}}{MG \text{ (B-2,4)}}$$

$$\text{Für Amaropandin:} \quad K_{AP} = \frac{570}{154} = \underline{3,7}$$

$$\text{Für Amarogentin:} \quad K = \frac{604}{154} = 3.92$$

Da jedoch für Amarogentin E immer um 1/3 höher ist als bei B-2,4, muß der Quotient mit 2/3 multipliziert werden. Da auch dieser Faktor für diese Bestimmung konstant bleibt, kann er in K aufgenommen werden.

$$K_{AG} = 3.92 \times 2/3 = \underline{2.618}$$

Die Auswertung kann demnach auf die folgenden verschiedenen Arten vorgenommen werden:

- 1) Man kann z.B. unter Berücksichtigung der irreversiblen Adsorption aus den Eichgeraden der Bitterstoffe oder mit Hilfe der molaren Eichgeraden, die mit B-2,4 aufgestellt werden können, den der gefundenen Extinktion entsprechenden Gehalt entnehmen.
- 2) Als zweite Möglichkeit bietet sich die Berechnung des Gehaltes mit Hilfe einer gleichbehandelten Bitterstofftestlösung an.
- 3) Den dritten Weg stellt die Umrechnung des Gehalts aus den mitbestimmten Extinktionswerten der Bezugssubstanz

B-2,4 nach der besprochenen Formel 2 (S. 7c) dar.

Somit kann die Gehaltsbestimmung der Bitterstoffe auch ohne Amarogentin-Testlösung durchgeführt werden.

4.4 Bestimmung von Gentiopikrosid

Die Bestimmung des Gentiopikrosidgehaltes ist für die Ermittlung der Drogenbitterwerte nicht notwendig.

Um den Gehalt an Gentiopikrosid in der Droge in Abhängigkeit von verschiedenen Umwelteinflüssen (wie Klima, Trocknung und Lagerung) zu studieren, kann aber eine genaue chemische Bestimmungsmethode von großem Interesse sein.

Zur Gehaltsbestimmung von Gentiopikrosid eignet sich die Anthron-Methode. Als Bezugssubstanz kann hier Glucose verwendet werden.

Die Drogen-Extrakte werden mit Hilfe der beschriebenen Chromatographie auf S.18 aufgetrennt, und durch die Fluoreszenzminderung bei UV 254 nm wird die Gentiopikrosid-Zone markiert, abgelöst und mit gleichen Teilen Wasser und Methanol am Whirli-Mixer extrahiert.

Unter Eiskühlung wird Anthronlösung zugesetzt. Diese Lösung wird im kochenden Wasserbad erhitzt, mit Eis abgekühlt, zentrifugiert und die Extinktion bei 620 nm im Zeiss-Photometer gemessen.

Mit der Anthron-Schwefelsäure-Lösung reagiert nur der hydrolytisch gespaltene Glucoseanteil des Gentiopikrosids. Er bildet ein Furfurolderivat, das mit dem Anthron einen blaugefärbten Komplex ergibt. Das Adsorptionsmaximum dieses Farbstoffes liegt bei 620nm.

Bestimmt man gleichzeitig mit der Probelösung eine Glucose-Standardlösung, so kann man aus dem Verhältnis der gemessenen Extinktionen entnehmen, wieviel Gentiopikrosid umgesetzt wurde.

Für die Auswertung der Analysenergebnisse kann folgende Umrechnungsformel verwendet werden:

Umrechnungsformel 3:

$$M_{GP} = \frac{E_{GP}}{E_{Glu}} \cdot 1,98 \cdot M_{Glu}$$

M_{GP} = Menge Gentiopikrosid in μg
 M_{Glu} = Menge Glucose in μg
 E = Extinktion

$$1,98 = \frac{356}{180} = \frac{\text{Molekulargewicht von Gentiopikrosid}}{\text{Molekulargewicht von Glucose}}$$

Der Gehalt an Gentiopikrosid kann auch über eine Glucose-Eichgerade bestimmt werden.

Hierzu wurden 0,88 mg wasserfreie Glucose in 10 ml Wasser gelöst. 0,1 - 0,8 ml davon wurden in einer Versuchsreihe mit Anthron-Reagenz versetzt, wie beschrieben weiterbehandelt und die Extinktionen gemessen. Wir fanden folgende Werte (Tabelle 8), die in das Diagramm (S. 75 , Abb. 16) eingetragen sind:

Tabelle 8: Glucose; 0,88 mg in 10 ml Wasser

ml	μg	1. Best.		2. Best.	
		E (620 nm)	100 μg	E (620 nm)	100 μg
0,1 ml	8,8	0,071	0,807	0,064	0,725
0,2	17,6	0,133	0,757	0,158	0,90
0,3	26,4	0,218	0,825	0,229	0,87
0,4	35,2	0,303	0,86	0,292	0,83
0,5	44,0	0,387	0,88	0,375	0,85
0,6	52,8	0,458	0,88	0,432	0,82
0,7	61,6	0,521	0,845	0,528	0,86
0,8	70,4	0,601	0,87	0,594	0,845
		$\bar{\phi} = 0,84$		$\bar{\phi} = 0,85$	

Im Durchschnitt fanden wir für 100 μg Glucose eine Extinktion von 0,845.

Aus der Eichgerade für Glucose läßt sich rechnerisch eine Gerade für Gentiopikrosid aufstellen. Sie verläuft so, daß 0,1 μ mol Gentiopikrosid (= 35,6 μ g) die gleiche Extinktion zeigen wie 0,1 μ mol Glucose (= 18 μ g).

Zur Kontrolle wurde mit Gentiopikrosid-Reinsubstanz eine Eichgerade aufgestellt. Es wurden 1,17 mg Gentiopikrosid in 3 ml Methanol p.a. gelöst und mit Hilfe der Anthron-Methode folgende Verdünnung untersucht:

Tabelle 9: Gentiopikrosid

ml	μ g Gentiopikr.	F (620 nm)	F (100 μ g)
0,1 ml	39	0,15	0,385
0,2	78	0,312	0,403
0,3	117	0,46	0,392
0,4	156	0,63	0,403
0,5	195	0,77	0,394
0,6	234	0,98	<u>0,418</u>
<u>Durchschnitt für 100 μg:</u>			<u>0,396</u>

Die gefundenen Extinktionen lagen alle auf der theoretisch errechneten Gerade (s. Abb. 16). Dadurch war gesichert, daß im Gentiopikrosidmolekül nur der Glucoseanteil eine Reaktion mit Anthron-Schwefelsäure gibt, und das Aglykon keine störenden Einflüsse auf die photometrische Bestimmung hat.

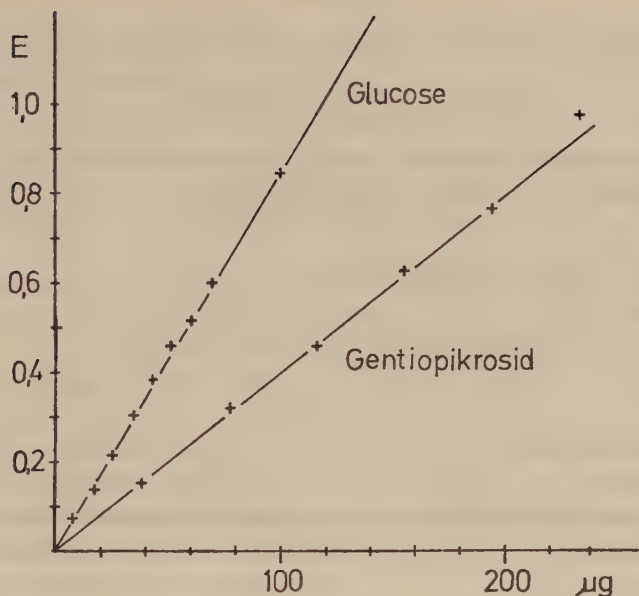


Abb. 16: Eichgerade von Glucose und Gentiopikrosid

Eine irreversible Adsorption an Kieselgel kann dadurch vermieden werden, daß das Kieselgel erst nach Beendigung der Reaktion abzentrifugiert wird.

Für oben genannte Stammlösung war pro 100 μg Gentiopikrosid bei der Direktmessung eine durchschnittliche Extinktion von 0,396 (abgerundet 0,4) zu finden. Sie gab nach DC-Trennung eine Extinktion von 0,41. Die gleichzeitig direkt bestimmte Glucoselösung zeigte eine Extinktion von 0,82 für 100 μg Substanz.

Die Berechnung soll an einem einfachen Beispiel mit der Formel 3 (S.73) demonstriert werden.

Für 100 μg eingesetzten Gentiopikrosids war eine Extinktion von 0,41 zu erhalten. Die entsprechenden Werte der Glucose

betrugen:

$$E = 0,82 \text{ für } 100 \mu\text{g}.$$

Gesucht werden nach der Formel die μg Gentiopikrosid, die in diesem Fall bekannt sind ($= 100 \mu\text{g}$).

$$\frac{E_{\text{GP}}}{E_{\text{Glu}}} \cdot 1,98 \cdot M_{\text{Glu}} = M_{\text{GP}}$$

$$\frac{0,41}{0,82} \cdot 1,98 \cdot 100 = x$$

$$x = 99$$

Gefunden wurden $99 \mu\text{g}$ Gentiopikrosid, eingesetzt waren $100 \mu\text{g}$.

4.5. Anwendungsbeispiele

4.5.1 Wertbestimmung von Radix Gentianae pannonicae

Am Beispiel von *Gentiana pannonica* sollen noch einmal die einzelnen Teilschritte einer Gehaltsbestimmung mit Hilfe der diazotierten Sulfanilsäure veranschaulicht werden.

Für die Untersuchung wurden 5 g frische, auf 1,2 g im Trockenschrank bei 40°C getrocknete Wurzeln, mit Methanol quantitativ extrahiert. Nach Filtrieren und Einengen des Lösungsmittels wurde der Extrakt auf 10 ml Stammlösung gebracht.

Mehrere Konzentrationen der Stammlösung wurden auf einer Kieselgelplatte chromatographiert und die Bitterstoffzonen bei UV 254 nm markiert. Bei dieser Droge sind Amarogentin und Amaropanin von Interesse. Die entsprechenden Kieselgelzonen wurden abgeschabt, mit Methanol extrahiert und mit den Reagenzlösungen (Natrium-nitrit und Sulfanilsäure) versetzt. Nach 15 Minuten wurde Natrium-Carbonat zugefügt,

gut geschüttelt und die Extinktion bei 470 nm am Photometer gemessen.

Wir erhielten folgende Extinktionen für 0,2 ml Stammlösung:

Amaropinin	0,195
Amarogentin	0,165

Aus der Eichgerade der Testsubstanzen entnehmen wir die μg -Bitterstoffe, die den gefundenen Extinktionen entsprachen. In 0,2 ml Stammlösung waren 42,6 μg Amaropinin und 26,6 μg Amarogentin enthalten.

Der endgültige prozentuale Gehalt an Bitterstoffen in der Droge ergab sich durch Umrechnung aus der Konzentration in 10 ml Stammlösung. Diese war gleichzusetzen mit 5 g Frischdroge oder 1,2 g getrocknete Droge. Z.B. errechnet man für Amaropinin folgende Werte:

10 ml Stammlösung	=	1,2g Droge enthalten 2,13 mg Amaropinin
		1,0 g Droge enthält 1,78 mg Amaropinin
		100,0 g Droge enthalten 178 mg = 0,178g AP

d.h., die getrocknete Droge enthält 0,178 % Amaropinin.

Man kann den Gehalt auch auf die frische Droge beziehen. Die so errechneten Werte für Amaropinin und Amarogentin sind in der nachfolgenden Tabelle zu finden.

Tabelle 10:

	Gehalt bezogen auf Frischgewicht	bezogen auf Trockengewicht
Amarogentin	0,028 %	0,111 %
Amaropinin	0,043 %	0,178 %

Mit diesen Zahlen kann man den Bitterwert der Droge berechnen.

Umrechnung von Bitterstoffgehalt auf Bitterwert

a) bezogen auf Frischgewicht der Droge (= 5 g)

1 g Droge enthält 0,28 mg Amarogentin und 0,43 mg
Amaropinin

1 mg AG hat einen Bitterwert von:	58 000	
0,28 mg	x	<u>x = 16 250</u>

1 mg AP hat einen Bitterwert von:	20 000	
0,43 mg	y	<u>y = 8 600</u>

Summe: 16 250 + 8 600 = 24 850

Somit kann man für 1 g Droge einen Bitterwert von 24 850
(abgerundet 24 900) erwarten.

b) Bezieht man den Bitterstoffgehalt auf die 1,2 g getrock-
nete Droge, so errechnet man folgenden Bitterwert:

1 g Wurzeln enthalten 1,11 mg Amarogentin und 1,78 mg
Amaropinin

1 mg AG hat einen Bitterwert von:	58 000	
1,11 mg	x	<u>x = 64 500</u>

1 mg AP hat einen Bitterwert von:	20 000	
1,78 mg	y	<u>y = 35 600</u>

Summe: 64 500 + 35 600 = 100 100

Der Bitterwert dieser Wurzel beträgt bezogen auf das Frisch-
gewicht 24 850, auf das Trockengewicht 100 100.

Üblich ist die Angabe des Bitterwertes bezogen auf das
Trockengewicht.

4.5.2 Einfluß der Trocknung auf die Droge

Vor Beginn der Wertbestimmung einer Droge war der Wassergehalt der Droge zu prüfen, da dieser je nach Trocknungszustand großen Schwankungen unterworfen sein kann. Grundsätzlich sind frische und getrocknete Wurzeln zu unterscheiden. Eine frische Droge enthält im Durchschnitt 60-80 % Wasser. Die luftgetrocknete Droge enthält durchschnittlich noch 6-8 % Wasser.

Die Wassergehaltsbestimmung der frischen Droge erfolgte in Anlehnung an das Schweizer Arzneibuch (Helv. VI, Band 1, S. 79) mit Hilfe einer Neoclevenger-Apparatur. Die abgewogene Drogenmenge wird mit Trichloäthylen als Lösungsmittel zum Sieden gebracht. Während das Wasser sich als Oberphase im graduierten Teil der Apparatur sammelt, kann Trichloräthylen wieder zurückfließen. Der Gehalt an Wasser wird volumetrisch abgelesen.

Zur Bestimmung des Trocknungsverlustes der getrockneten Wurzeln wird die pulverisierte Droge im Trockenschrank bei 40°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der durchschnittliche Verlust, der größtenteils auf den Wassergehalt zurückzuführen ist, liegt bei ca. 8 %.

Der Trocknungsvorgang und die Art der Trocknung haben großen Einfluß auf den Gehalt an Bitterstoffen. Um diese Abhängigkeit kennenzulernen, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

a) Vergleich zwischen frischer und getrockneter Wurzel

Um den Gehaltsunterschied an Bitterstoffen festzustellen, wurden frische Wurzeln in zwei Reihen untersucht. Ein Teil der Droge wurde in frischem Zustand wie üblich extrahiert und einer Gehaltsbestimmung unterworfen (Reihe I).

In der zweiten Reihe wurden die Wurzeln vor der Analyse im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (Reihe II). Die ursprüngliche Einwaage der frischen Droge betrug bei allen Proben 5 g. Nach der Trocknung wurde das Trockengewicht wieder festgestellt. Aus der Differenz läßt sich der Wassergehalt berechnen.

Für die Bestimmung verwendeten wir drei verschiedene Sorten von *Gentiana lutea* (A, B, C).

Davon waren in der Reihe II nach der Trocknung bei A 1,2 g, bei B 1,5 g und bei C 1,0 g als Trockensubstanz übrig. Daraus ist zu ersehen, daß der Wassergehalt in den verschiedenen Proben unterschiedlich war und für A 76 %, für B 70 % und für C 80 % betrug, im Mittel also 70 - 80 %.

Für jede Probe wurde mit Hilfe der Sulfanilsäure-Methode der Gehalt an Amarogentin bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 zusammengestellt. Die Spalte FG gibt den Gehalt des Amarogentin bezogen auf 5 g Frischdroge (FG) wieder. Spalte TG bezieht die gefundenen Amarogentin-Konzentrationen auf das Trockengewicht (TG) der Proben.

Tabelle 11:

	Reihe I		Reihe II		% - Verlust
	FG	TG	FG	TG	
A	0,048 %	0,2 %	0,033 %	0,137 %	31 %
B	0,052 %	0,173 %	0,044 %	0,147 %	16 %
C	0,101 %	0,51 %	0,066 %	0,33 %	35 %

Während Probe A und B etwa gleichen Amarogentingehalt aufwiesen, zeigte Probe C etwa den zweifachen Wert. Möglicherweise ist diese Abweichung auf Standortunterschiede zurückzuführen. Die Pflanze der Probe C besaß auch schmalere Blätter. Miteinander zu vergleichen sind immer nur die beiden Spalten FG bzw. TG.

Dieser Aufstellung ist eindeutig zu entnehmen, daß der Gehalt an Amarogentin durch den Trocknungsprozess abnimmt. Der prozentuale Verlust ist ebenfalls in der Tabelle 11 (Spalte: %-Verlust) verzeichnet und beträgt im Durchschnitt etwa 30 %.

b) Einfluß verschiedener Trocknungsverfahren

Wurzeln der *Gentiana lutea* wurden zu je 5 g Frischgewicht portioniert. Eine Probe wurde direkt ohne Trocknen untersucht. Drei weitere Proben wurden auf folgende Art getrocknet.

a) Gefriertrocknung

b) im Trockenschrank bei 40°C

c) nach Bedampfen mit Äthanol bei 40°C im Trockenschrank

5 g frische Wurzeln ergaben:

a) 1,8 g Trockengewicht, d.h. 64 % Wassergehalt

b) 1,55 g Trockengewicht, d.h. 69 % Wassergehalt

c) 1,9 g Trockengewicht, d.h. 62 % Wassergehalt

Tabelle 12: Amarogentingehalt

	bezogen auf Trockenge- wicht	bezogen auf Trockenge- wicht	Verlust	
frisch	0,036 %	0,103 % (65% H ₂ O)	frisch trocken	
a) Gefrier- trock.	0,032 %	0,089 %	11 %	11 %
b) bei 40°C	0,024 %	0,0775%	33 %	10 %
c) +ETOH/40°C	0,0295%	0,0775%	18 %	25 %

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, daß der Verlust an Amarogentin durch Gefriertrocknung am geringsten ist und ca. 10 % beträgt, während andere Verfahren 20 - 30 % Verlust verursachen.

4.5.3 Vergleich der Methoden zur Bitterwertbestimmung

Um zu zeigen, daß der auf organoleptische Weise bestimmte Bitterwert mit den über die chemische Gehaltsbestimmung errechneten Bitterwerten direkt korreliert, wurde mit den Extrakten der Proben A, B, C von *Gentiana lutea* folgender Versuch durchgeführt:

Die Bitterwerte der genannten Proben wurden zunächst auf sensorischem Wege (nach ÖAB 9) bestimmt und zweitens aus dem ermittelten Amarogentin-Gehalt errechnet.

Der Rechenvorgang soll am Beispiel der Probe A/Reihe I erläutert werden:

Diese Droge enthält 0,048 % Amarogentin, das heißt 48 mg Amarogentin in 100 g Wurzel. Der Bitterwert bezieht sich aber auf 1 g Wurzel. In 1 g Wurzel sind 0,48 mg Amarogentin enthalten. Die Bitterwirkung, die durch 0,48 mg Ama-

rogentin hervorgerufen wird, ist wie folgt zu errechnen.

1 g	Amarogentin	58 000 000
1 mg	Amarogentin	58 000
0,48 mg	Amarogentin	x
x = 27 800		

Dies bedeutet, daß allein durch die Bitterwirkung des in 1 g Droge enthaltenen Amarogentins ein Bitterwert von 27 800 verursacht wird. Für die gleiche Droge wurde auf sensorischem Wege ein Bitterwert von 26 000 ermittelt.

Einen Vergleich der organoleptisch bestimmten Bitterwerte und der über die Gehaltsbestimmung errechneten Werte wird in der nächsten Tabelle angestellt.

In der Tabelle 13, S. 84 sind folgende Werte aufgezeichnet:

1. Der prozentuale Gehalt an Amarogentin, der mit der Sulfanilsäuremethode ermittelt wurde
2. Der organoleptisch bestimmte Bitterwert der Droge
3. Die mit Hilfe des Amarogentingehalts errechneten Bitterwerte
4. Die prozentualen Unterschiede dieser beiden Bitterwerte.

Der Unterschied zwischen chemisch und organoleptisch ermittelten Bitterwerten liegt in den meisten Fällen zwischen 2 - 4 %. Einige Werte fallen aber durch eine größere Abweichung von der Norm auf. Da die Fehlerquote bei der chemischen Bestimmung in etwa die gleiche sein dürfte, muß diese Abweichung auf die schlechte Reproduzierbarkeit der organoleptischen Bestimmung zurückzuführen sein.

Tabelle 13

	Gehalt an Amarogentin in %	Bitterwert organolep- tisch	Bitterwert berechnet	Unterschied in %
<u>Reihe I</u>				
<u>auf Frischgewicht bezogen</u>				
A	0,048	26 000	27 800	6,5
B	0,052	33 000	31 500	4,5
C	0,101	57 000	59 200	3,7
<u>auf Trockengewicht bezogen</u>				
A	0,2	119 000	116 000	2,5
B	0,173	110 000	100 000	9,1
C	0,51	286 000	290 000	1,4
<u>Reihe II</u>				
<u>auf Frischgewicht bezogen</u>				
A	0,033	22 200	19 200	13,5
B	0,044	25 000	25 500	1,96
C	0,066	33 400	38 000	12,0
<u>auf Trockengewicht bezogen</u>				
A	0,137	83 000	79 700	4,0
B	0,147	84 000	85 300	1,57
C	0,33	167 000	191 200	12,5

4.5.4 Verteilung des Amarogentins innerhalb der Wurzeln

Bei vergleichenden Bestimmungen ist darauf zu achten, daß man Wurzeln gleichen Durchmessers untersucht. Der Grund dafür ist die unterschiedliche Verteilung der Bitterstoffe innerhalb von Rinde und Holz. Zur Klärung der Konzentrationsverhältnisse wurde folgender Versuch durchgeführt:

15,6 g Wurzeln der *Gentiana lutea* wurden so geteilt, daß 2,3 g (Frischgewicht) als Ganzes und der Rest getrennt in Rinde (1,2 g) und Holz (12,1 g) untersucht wurden.

Nach Trocknung bei 40°C hatten wir folgende Ausgangsmengen:

ganze Wurzel	0,5 g	(2,3 g Frischgewicht)
Rinde	0,4 g	(1,2 g Frischgewicht)
Holz	3,0 g	(12,1 g Frischgewicht)

Von diesen drei Proben wurden Methanol-Extrakte hergestellt und mit der Sulfanilsäure-Methode der Gehalt an Amarogentin bestimmt.

Tabelle 14: Der Gehalt an Amarogentin

Drogenteil	bezogen auf Trockengewicht	bezogen auf Frischgewicht
ganze Wurzel	0,176 %	0,038 %
Rinde	0,95 %	0,317 %
Holz	0,013 %	0,0033 %

Daraus ist zu erkennen, daß die Rinde, die gewichtsmäßig ca. 9 % der Gesamtwurzel darstellt, 91 % des Amarogentins enthält. Dies bedeutet, daß dickere Wurzeln einen wesentlich geringeren Gehalt an Amarogentin aufweisen als dünne, schmale Wurzeln.

5.0 ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde eine neue dünnschichtchromatographische Methode zur Identitäts- und Reinheitsprüfung der Enziandroge ausgearbeitet, die gleichzeitig den Nachweis aller bis heute bekannten Bitterstoffe der Enzianwurzel und ihrer Zubereitungen in ihrer genuinen Form gestattet.
2. Die DC-Untersuchung der verschiedenen offizinellen und nicht offizinellen Gentiana-Arten führten zur Entdeckung eines neuen phenolischen Bitterstoffes in *Gentiana pannonica* Scop.. Dieser wurde isoliert und durch Einsatz vor allem spektroskopischer Methoden in seiner Struktur aufgeklärt. Dieser Bitterstoff (Amaropanin) stellt den 3,3'-Dihydroxydiphenylcarbonsäure-ester des Swerosids, oder 5"-Desoxyamarogentin dar. Amaropanin ist außerdem in den Wurzeln von *Gentiana purpurea* L. und *Gentiana punctata* L. enthalten.
3. Die bisherige organoleptische Bitterwertsbestimmung wurde durch eine chemische Gehaltsbestimmung ergänzt bzw. ersetzt. Für die stark bitter schmeckenden phenolischen Acylbitterstoffe in den Enzianwurzeln wurde eine Bestimmungsmethode ausgearbeitet, die eine Auftrennung der einzelnen Bitterstoffe durch DC und eine Umsetzung mit diazotierter Sulfanilsäure beinhaltet. Als Bezugssubstanz kann außer den reinen Bitterstoffen auch die 2,4-Dihydroxybenzoesäure eingesetzt werden. Die Gehaltsbestimmung des wesentlich weniger stark bitter schmeckenden Gentiopikrosids wurde mit Hilfe der Anthron-Methode und Glucose als Bezugssubstanz durchgeführt.
4. Mit Hilfe dieser neuen chemischen Gehaltsbestimmung wurde die Abnahme des Bitterstoffgehaltes in der Droge während der Trocknung ermittelt.

5. Die organoleptisch ermittelten Bitterwerte und die mit den chemischen Methoden erhaltenen prozentualen Absolutwerte lassen sich miteinander korrelieren. Eine Umrechnung der Prozentwerte in Bitterwerte ist möglich.

EXPERIMENTELLER TEIL

6.0 HERKUNFT DER DROGEN

- 1.) *Gentiana lutea*:
 - a) frische Wurzeln: 12 Proben, jeweils 3 verschiedene Herkünfte (A, B, C) aus Kulturversuchen in Oberbayern von Dr. Ch. Franz, Institut für Gemüsebau der Techn. Universität München, Freising-Weihenstephan
 - b) französische Handelsdroge
 - c) aus den Karpaten, Schuler-Alm bei Kronstadt, Brasov
 - d) Maische, Destillationsrückstand bei der Schnapsherstellung
 - e) frische, getrocknete Wurzeln, Ernte 1973, Voralpen
- 2.) *Gentiana pannonica*:
 - a) 3 Proben, gegraben 1972 und 1973 im Raum Berchtesgaden
 - b) aus dem Raum Lenggries, Obb., Brauneck
- 3.) *Gentiana punctata*:
 - a) 2 Proben aus dem Raum Berchtesgaden
 - b) aus dem Botanischen Garten, München
 - c) von der Zeiser Alm, Herbarmaterial
- 4.) *Gentiana purpurea*:
 - a) aus Bienzler Rothorn
 - b) aus Lago Sfundau (Kt. Tessin), Cristallinapass, Schweiz
- 5.) *Gentiana asklepiadea*:
 - a) Botanischer Garten, München
 - b) Raum Kochel (gesammelt)

- c) Seeshaupt, Starnberger See (gesammelt)
- d) Kopaonik, Serbien

6.) *Gentiana clusii*:

- a) Botanischer Garten, München
- b) Murnau (gesammelt)
- c) Kochel (gesammelt)
- d) weißblühend: Rott/Ammersee (gesammelt)

7.) *Gentiana kochiana*:

- a) München, Viktualienmarkt
- b) von Fa. Kayser und Seiber, Rossdorf,
Odenwalder Pflanzenkulturen
- c) Botanischer Garten, München

<i>Gentiana cruciata</i> :	Fa. Kayser und Seiber, Rossdorf
<i>Gentiana septemfida</i> :	München, Viktualienmarkt
<i>Gentiana sino-ornata</i> :	Botanischer Garten, München
<i>Gentiana verna</i> :	Raum Murnau (gesammelt)
<i>Gentiana tergestina</i> :	Botanischer Garten, München
<i>Gentiana nivalis</i> :	Sestrière, Italien

Für die Beschaffung des frischen Pflanzenmaterials (*Gentiana lutea*, *Gentiana pannonica* und *Gentiana punctata*) danken wir in besonderer Weise Herrn Dr. Ch. Franz, Weißenstephan. Unser Dank gilt auch Herrn Professor Dr. H. Flück und Herrn Professor Dr. O. Sticher, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Herrn Dr. Kress, sowie Herrn P. Galle, Botanisches Institut der Universität München, außerdem der Firma Otto Frank, Augsburg.

7.0 ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN

7.1 Absteigende Papierchromatographie

Die papierchromatographische Untersuchung der Zucker wurde auf 2043 b Mgl-Papier der Firma Schleicher & Schüll, Dassel, durchgeführt.

Temperatur: 20 - 22°C

Laufzeit: 24 - 36 Stunden

Laufmittel: n-Propanol : Äthylacetat : Wasser (7:1:2)

7.2 Dünnschichtchromatographie

1) Adsorbens:

- a) Kieselgel-60-mesh-F 254-Fertigplatten der Firma Merck
- b) DC-Alufolien Cellulose, Art 5552 der Firma Merck

2) Laufmittelsysteme:

- a) Bitterstoffe: Aceton (DAB 7) : Chloroform p.a. : Wasser (80 : 20 : 0,5)
- b) phenolische Bitterstoffe: wassergesättigtes Äthylacetat; Chloroform:Methanol (9 : 1)
- c) Gentiopikrosid: wassergesättigtes Butanol
- d) Bitterstoffacetate: Benzol : Methanol (95 : 5)
- e) Zucker: Methyläthylketon : Essigsäure : Methanol (6 : 2 : 2);
Äthylacetat : Pyridin : Wasser (2 : 1 : 2)-Oberphase

3) Sprühreagentien:

Phenolreagentien (alle Phenolreagentien sind kurz vor dem Besprühen zuzubereiten)

- a) Echtrotsalz-B (65) der Firma Serva : 0,2 %ige wässrige Lösung,
Nachbesprühen: a) Na-borat 0,1 molare wässrige Lösung
b) Na-carbonat 20 %ige wässrige Lösung

- b) Echtblausalz-E (66) der Firma Serva : 0,5 %ige
wässrige Lösung
Nachbesprühen: 0,1 n Na-hydroxyd-Lösung
- c) Echtschwarzsalz-K (67) der Firma Serva : 0,1 %ige
wässrige Lösung
Nachbehandlung: 10 Min. bei 110°C erhitzen
- d) Diazotierte Sulfanilsäure (81)
25 g Sulfanilsäure werden in 125 ml 10 %iger Kalilauge gelöst. Nach dem Abkühlen wird mit 100 ml 10 %iger Natriumnitritlösung versetzt. Diese Lösung wird vorsichtig in eisgekühlte Salzsäure gegeben. Das gebildete Diazoniumsalz wird abgenutscht, mit Eiswasser, Äthanol und Äther gewaschen und luftgetrocknet. Als Sprühreagenz wird 0,1 g Salz in 20 ml 10 %iger Na-Carbonatlösung gelöst.

Sprühreagentien zum Nachweis des Zuckeranteils

- e) Anthron-Schwefelsäure: (68) 0,2 % in konz. Schwefelsäure
Nachbehandlung: 5 Min. bei 110°C erhitzen
- f) Formalin-Schwefelsäure: (69) 1 : 9 gelöst
Nachbehandlung: 5 Min. bei 130°C erhitzen
- g) Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC): (62, 63)
a: 0,2 %ige Lösung von TTC in wassergesättigtem Butanol
b: 2n methanolische KOH-Lösung
Gleiche Teile a und b werden kurz vor dem Besprühen vermischt.
Nachbehandlung: 20 Min. bei 80°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre erwärmen

- h) Anilinphthalat: (82) 0,93 g Anilin und 1,66 g Phthalsäure werden in 100 ml wassergesättigtem Butanol gelöst.

Nachbehandlung: 5 Min. bei 105°C erhitzen.

7.3 Präparative Dünnschichtchromatographie

0,5 ml methanolische Drogenextrakte wurden strichförmig auf einer Kieselgel-F 254-Fertigplatte aufgetragen und auf die unter 7.2 beschriebene Weise entwickelt. Die in Frage stehenden Zonen wurden unter UV-Licht 254 nm markiert, ausgeschabt, in eine kleine Säule gefüllt und mit Methanol erschöpfend eluiert. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Methanol p.a. aufgenommen. Diese Lösung wurde für weitere Untersuchungen verwendet.

7.4 Säulenchromatographie

Kieselgelsäule:

Kieselgel 60 mesh (0,05 - 0,2 mm) der Firma Merck wurde mit dem jeweils ersten Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt.

7.5 Aufbereitung der Drogen

a) Trocknung an der Luft:

Die frischen Wurzeln wurden in etwa 0,5 mm dicke Stücke geschnitten und in einem trockenen, gut durchlüfteten Raum in dünner Schicht zur Trocknung bei Zimmertemperatur aufgestellt.

b) Im Trockenschrank:

Die wie oben geschnittenen Wurzeln wurden im Trockenschrank bei 40°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

c) Gefriertrocknung:

Die geschnittene Frischdroge wurde in dünner Schicht ausgebreitet und bei -20°C eingefroren. Die Entfernung des Wassers

erfolgte nach Überführung des gefrorenen Drogenmaterials in eine Leybold-Gefriertrocknungsanlage (G o7) durch Sublimation im Vakuum.

7.6 Bestimmung des Wassergehaltes

a) Wassergehalt der frischen Droge (nach Helv. VI):

Die geschnittenen frischen Wurzeln wurden unter Zusatz von Trichloräthylen als Treibmittel, in einer Neoclevenger-Apparatur destilliert. Die Menge des Wassers wurde volumetrisch bestimmt und bezogen auf die eingesetzte Drogenmenge in Prozenten angegeben.

b) Trocknungsverlust der getrockneten, gelagerten Droge:

Die pulverisierte Enziandroge wurde im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz bei 40°C getrocknet. Der Gewichtsverlust wird in Prozenten angegeben.

7.7 Organoleptische Bitterwertsbestimmung

Die Bestimmung des Bitterwertes erfolgte nach der Vorschrift des ÖAB 9. Der Korrekturfaktor wurde mit Hilfe einer Chinhydrochlorid-Standardlösung bestimmt.

Der persönliche Korrekturfaktor betrug, nach DAB 7-BRD bestimmt, $K = 1,087$.

7.8 Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte:

Die Substanzen wurden bei angepaßten Temperaturen in der Trockenpistole über Diphosphor-pentoxid getrocknet. Der Schmelzpunkt wurde auf der Kofler-Heizbank der Firma Reichert, Wien, gemessen. Die Werte sind unkorrigiert.

Optische Drehung:

Die Messungen wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Firma Zeiss (LEP A 2) durchgeführt.

Circular-dichroismus:

Die CD-Kurven wurden mit einem Cirkulardichrographen am Organisch-chemischen Institut der Universität Bonn gemessen. Als Lösungsmittel diente Acetonitril.

UV- und Vis.Messungen:

Einzelmessungen der quantitativen Analysen wurden an einem Zeiss-Opton-Spektralphotometer PQM II in einer 1 cm Küvette durchgeführt.

UV-Spektren wurden am Beckman DK 2A ratio-recording Spektralphotometer aufgenommen.

IR-Spektren:

Die in KBr eingebetteten Substanzen wurden in unserem Institut mit dem Beckman IR-8 Spektrophotometer gemessen.

NMR-Spektren:

Die NMR-Spektren wurden im Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, an einem Varian HA-100 MHz Kernresonanzspektrometer aufgenommen.

Massenspektren:

Die Spektren wurden mit einem MS-30 Fa. AEI bei 60 eV und 300 μ A/4kV unter folgenden Meßbedingungen aufgenommen.
St. 200⁰, Pt:150⁰, SEV= 9,5, SIG = 10^{-6} , AIG = 2.10^{-7} ,
Res. 1000, Direkteinlaß

Herrn O. Seligmann danke ich für die Aufnahme der UV-, IR- und Massenspektren und die Unterstützung bei der Diskussion und Auswertung.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren bin ich Herrn Priv.-Doz. Dr. J.Sonnenbichler, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, zu Dank verpflichtet.

Für die Aufnahme der Circular dichrogramme danke ich Herrn Professor Dr. G. Snatzke, Organisch-chemisches Institut der Universität Bonn.

8.0 DURCHFÜHRUNG DER UNTERSUCHUNGEN

8.1 Identifizierung der Bitterstoffe

a) Extraktion:

2 g zerkleinerte frische oder pulverisierte, trockene Droge werden dreimal mit je 50 ml Methanol jeweils 15 Min. am Omni-Mixer unter Eiskühlung extrahiert, danach filtriert. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 10 ml Methanol aufgenommen, in ein 10-ml-Meßkölbchen filtriert und auf genau 10ml aufgefüllt.

Für die Dünnschichtchromatographie werden 50 µl dieser Lösung entnommen und bandförmig (20 x 4 mm) aufgetragen.

b) Adsorbens: Kieselgel-60-mesh-F 254-Fertigplatten der Firma Merck

c) Fließmittelsystem: Aceton : Chloroform p.a. : Aqua dest.
(80 : 20 : 0,5)

d) Laufzeit: 60 - 70 Min. bei Kammersättigung über eine Wegstrecke von 15 cm

e) Detektion: Fluoreszenzminderung bei UV 254 nm
Eigenfluoreszenz bei UV 360 nm

f) Sprühreagenzien:

Echtrotsalz-B der Firma Serva (0,2 %ige wässrige Lösung = neutrale Reaktion). Nach Lufttrocknung werden die Chromatogramme im Tageslicht betrachtet. Anschließend erfolgt das Besprühen mit einer 0,1 m Na-borat-Lösung (pH = 9,0). Nach Trocknung und erneuter Betrachtung wird mit einer 20 %igen wässrigen Na-carbonat-Lösung (pH=12) besprüht.

Ergänzende Nachweisreaktionen: (s. S. 91)

Echtblausalz-B

Echtschwarzsatz-K

Diazotierte Sulfanilsäure

8.2 Charakterisierung der Xanthonverbindungen

a) Saure Hydrolyse des Xanthondiglykosids:

Das durch präparative Dünnschichtchromatographie gewonnene Xanthondiglykosid wurde mit 5 ml 5 %iger Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Danach wurde das Aglykon durch Ausschütteln mit 10 ml Chloroform aus dem Hydrolysat gewonnen. Die Chloroformphase wurde für Aufnahme von UV-Spektren und DC-Prüfungen verwendet.

b) UV-Analyse des Xanthondiglykosids:

Gentisin :	nm: 238, 259, 308, 370
+ Na-acetat:	238, 259, 308, 370
Isogentisin:	235, 259, 313, 370
+ Na-acetat:	- 270, 345, 370 (Schulter)
Xanthondiglykosid:	206, 235, 260, 300, 370
+ Na-acetat:	206, 229, 261, 310, 368
Hydrolysat:	206, 234, 259, 310, 370

c) Identifizierung der Zucker:

Der wässrige Anteil des Hydrolysats wurde mit Dowex-Ionenaustausch-Harz der Firma Serva neutralisiert, im Vakuum eingengt und in 1 ml Pyridin aufgenommen.

Diese Lösung wurde zur Identifizierung der Zucker auf Cellulose-Fertigplatten in dem Laufmittel Äthylacetat: Pyridin:Wasser (2 : 1 : 2) chromatographiert. Glucose war bei R_F 0,49; eine weitere Hexose bei 0,43 zu finden. Xylose (R_F 0,61) und Gentiobiose (R_F 0,35) wurden zum Vergleich ebenfalls chromatographiert. Zur Detektion wurde mit Anilinphthalat besprüht.

8.3 Isolierung von Amaropanaxin

8.3.1 Extraktion

600 g frische Wurzeln von *Gentiana pannonica* Scop. wurden zerkleinert und am Omni-Mixer portionsweise mit Methanol extrahiert, bis der Drogenrückstand nicht mehr bitter schmeckte. Dafür wurden ca. 10 l Methanol benötigt. Nach Filtration wurde die Lösung im Vakuum zur Trockene eingengt und in 1 l Wasser aufgenommen. Die folgende Ausschüttungsreihe begannen wir mit Benzol, wobei 1,5 l in drei Portionen verwendet wurden. Die Benzolphase wurde verworfen. Danach wurde die wässrige Phase solange mit Äthylacetat ausgeschüttelt, bis chromatographisch keine phenolischen Bitterstoffe mehr nachzuweisen waren. Wir erhielten ca. 4 l Äthylacetat-Lösung, die anschließend im Vakuum eingengt wurde.

In der wässrigen Phase bleibt Gentiopikrosid, das durch Ausschütteln mit Butanol zu gewinnen ist.

Der Rückstand der Äthylacetatphase wurde in ca. 20 ml Methanol gelöst und mit ca. 10 g Kieselgel angerührt.

Diese Suspension wurde vorsichtig zur Trockene eingengt und auf eine Kieselgelsäule gegeben.

8.3.2 Säulenchromatographie

Säulengröße: Ø 4 cm, Höhe 40 cm

Füllmittel: Kieselgel 60 mesh

300 g Kieselgel wurden mit Chloroform suspendiert und in die Säule gefüllt. Das extraktbeladene Kieselgel wurde auf die Säule gebracht und mit den folgenden Lösungsmittelmischen der Reihe nach entwickelt:

1,5 l Chloroform
1,5 l Chloroform : Methanol (97 : 3)
1,5 l Chloroform : Methanol (93 : 7)
4,5 l Chloroform : Methanol (90 : 10)

Die letzte Mischung wurde so lange verwendet, bis die gesamte Menge an Bitterstoffen eluiert war.

Tropfgeschwindigkeit: 25 Tropfen pro Min.

Die ersten 3 l des Säuleneluats waren frei von Bitterstoffen. Danach wurde die Säule an einen Fraktionssammler angeschlossen, und Fraktionen zu 15 ml aufgefangen.

Nach DC-Prüfung wurden die entsprechenden Fraktionen von Amarogentin und Amaropinin vereinigt.

Die Amaropinin-haltige Lösung wurde im Vakuum bis auf 2 ml eingeengt. Nach Zugabe von ca. 5 ml Chloroform p.a. wurde die Lösung filtriert. Das Filtrat wurde tropfenweise mit ca. 1 ml Benzol p.a. versetzt. Es war darauf zu achten, daß sich die dabei entstehende Trübung durch Rühren löst. Die noch klare Lösung wurde zur Kristallisation aufgestellt.

Amaropinin fiel in Form von weißen Nadeln aus. Umkristallisation erfolgte aus Chloroform p.a./Aceton p.a. und Benzol p.a. Schmp. : 178°C.

Aus der Amarogentin-haltigen Lösung war auf die gleiche Weise Amarogentin zu gewinnen.

Die Ausbeute betrug 50 mg Amaropinin und 80 mg Amarogentin.

8.3.3 Herstellung der Derivate

Permethylierung nach HAKOMORI (83)

Ausgehend von ca. 1 mg Substanz wurde die Permethylierung in 0,5 mg wasserfreiem Dimethylformamid (DMF) mit 0,2 mg NaH-Pulver und 1 ml CH₃J unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer Stunde wurde das

Gemisch mit zweimal 10 ml Äther ausgeschüttelt. Das zurückbleibende Öl wurde bei 10^{-1} Torr getrocknet und im Direkt-einlaß des Massenspektrometers MS-30 gemessen.

Peracetylierung

20 mg Amaropanin wurden mit je 1 ml Essigsäureanhydrid und Pyridin 48 Std. bei Zimmertemperatur behandelt. Diese Lösung wurde unter Rühren in 50 ml eisgekühltes Wasser gegeben und 1 Std. gerührt. Der Niederschlag wurde abgenutscht und in absolutem Äthanol gelöst. Zur Reinigung wurde diese Lösung über eine Kieselgel-60-mesh-Säule (1,5 cm x 6 cm Höhe) mit Chloroform/Methanol (99 : 1) chromatographiert. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen fiel ein weißer Niederschlag aus, der aus Äthanol/Wasser umkristallisiert wurde.

Der Schmelzpunkt des Amaropaninperacetates betrug 79°C (unkorr.).

8.3.4 Meßwerte von Amaropanin

$\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_{12}$ (572, 55)	Ber.: C:61,05 %	H:5,27 %
	Gef.: C:60,9 %	H:5,68 %

UV: (0,540 mg/50 ml Methanol p.a.)

max. : 210 nm (log ϵ = 4,39)

240 nm (Schulter)

315 nm (log ϵ = 3,48)

IR: Amaropanin 1,5 mg/150 mg KBr

3400 (OH-Bande), 1680 (Lactongruppe), 1600 (konjugierte Doppelbindungen), 1580, 1430 (Phenol. Teil), 1270, 1195, 1065, 980, 990 (Vinylgr.) 930, 890, 830, 810, 785, 700 cm^{-1} .

Amarogentin 1,4 mg/150 mg KBr

Amaroswerin 1,4 mg/150 mg KBr

(siehe Abb. 5 und Tabelle 15 S. 101)

NMR: Amaropandin in Vergleich mit Amarogentin
(in Aceton d_6 , 100 MHz, gegen TMS, int. ST.)
Siehe Tabelle 3, Seite 44)

MS: Amaropandin: base peak m/e 212 (relative Intensität: 100 %) M^+ 570 fehlt,
413 (2 %), 396 (3 %), 374 ($=M^+-196$ (196 = Aglycon), 2 %),
357 (2 %), 223 (10 %), 212 (100 %), 186 (Diphenyldiol,
90 %), 184 (24 %), 138 (24 %), 127 (30 %), 45 (24 %),
18 (10 %).

Amaropandinpermethyläther: base peak m/e 241 (100 %) M^+ fehlt,
558 (4 %), 530 (10 %), 502 (10 %), 445 (40 %), 431 (4 %),
414 (4 %), 397 (10 %), 273 (4 %), 258 (4 %), 241 (100 %),
208 (10 %), 206 (10 %), 204 (4 %), 198 (4 %), 189 (14 %),
187 (10 %), 155 (20 %), 135 (20 %), 123 (20 %), 109, 10
(20 %), 101 (20 %), 95 (36 %), 81 (36 %), 71 (40 %),
69 (40 %), 57, 55 (40 %), 43, 41 (40 %), 18 (40 %).

Amarogentin-permethyläther: base peak m/e 271 (100 %) $M^+ = 670$ (1 %)
475 (20 %), 443 (4 %), 271 (100 %), 155 (6 %), 101 (6 %),
97 (5 %), 81, 83 (4 %), 69, 71 (8 %), 57 (8 %), 41, 45
(84 %), 18 (12 %).

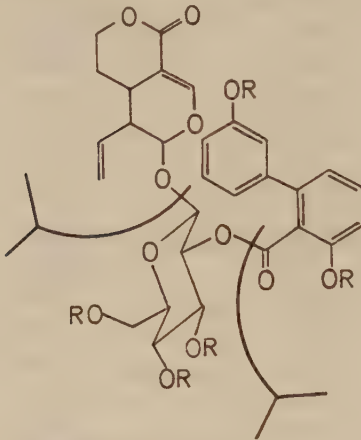
Tabelle 15: IR-Daten

Amaroswerin	Amarogentin	Amaroparin
3400 cm ⁻¹	3300 cm ⁻¹	3400 cm ⁻¹
2990	2970	3000
-	2910	2900
1680	1670	1680
1640	-	-
1600	1600	1600
-	1580	1580
-	1490	1490
-	-	1460
1430	1440	1430
1400	1400	1400
-	1350	1340
1310	1310	1310
1240	1250	1270
-	1215	1220
1200	1195	1195
1160	1170	1160
1150	1155	1155
-	1090	-
1050	1060	1065
1015	1020	1020
990	990	995
-	980	980
920	930	930
895	890	890
845	855	855
-	830	830
-	-	810
780	795	785
760	755	755
-	735	735
-	710	710
700	700	700
-	675	680
-		640

Zerfall des Moleküls

Seco-Iridoid **SI**

(Gentinteilstück : 195 ME)



Diphenylcarbon-
säure **DP** - Teil

R = Ac : 297 ME

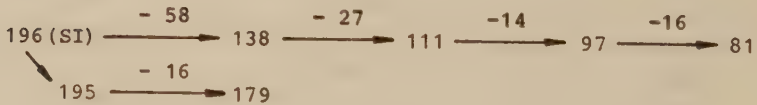
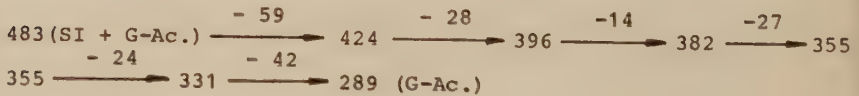
R = H : 213 ME

Glucose-Teilstück

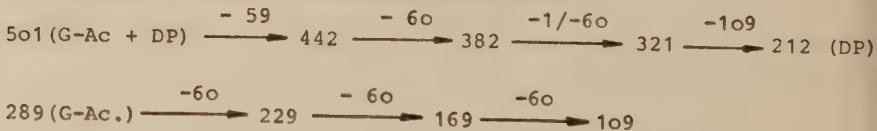
G

R = Ac : 288 ME

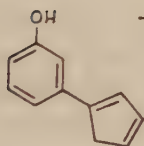
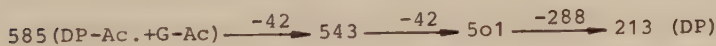
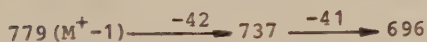
1.) Fragmentierung des Gentinteils:



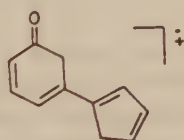
2.) Fragmentierung des Glucosebruchstücks:



3.) Fragmentierung des Diphenylcarbonsäureteils:



156



155



127

Amaropandin-peracetat: base peak 213 (100 %), $M^+ = 780$ (1 %)

780, 779 (1 %), 737 (2 %), 696 (4 %), 585 (12 %), 543 (30 %), 539 (6 %), 501 (10 %), 497 (2 %), 483 (2 %), 460, 459 (1 %), 442 (2 %), 430, 424 (2 %), 413 (2 %), 396 (4 %), 382 (2 %), 355 (3 %), 331 (2 %), 321 (2 %), 297 (10 %), 289 (8 %), 255 (60 %), 229 (14 %), 213 (100 %), 212 (60 %), 196 (7 %), 186, 184 (30 %), 179 (10 %), 169 (34 %), 157 (8 %), 138 (10 %), 127 (34 %), 115 (4 %), 109 (34 %), 97 (16 %), 81 (10 %), 69 (10 %), 55 (8 %), 43 (60 %).

Siehe Zerfallsschema und Spektren

Circular-dichroismus

Amaropandin: gemessen in Acetonitril, 0,9 mg/1,975 ml (nicht vollständig gelöst)

317 nm ($\Delta \epsilon$ = + 1,49)

252 nm ($\Delta \epsilon$ = - 7,96)

226 nm ($\Delta \epsilon$ = + 9,89)

Amarogentin: gemessen in Acetonitril, 0,55 mg/1,9768 ml

309 nm ($\Delta \epsilon$ = + 1,40)

265 nm ($\Delta \epsilon$ = - 9,89)

241 nm ($\Delta \epsilon$ = +10,51)

8.4 Quantitative Bestimmung der Enzian-Bitterstoffe

8.4.1 Vorbereitung der Droge

a) Extraktion:

5 g frische oder 2 g getrocknete, in 0,5 cm dicke Stücke geschnittene Droge werden dreimal mit je 100 ml Methanol jeweils 15 Min. am Omni-Mixer zerkleinert und extrahiert.

Die gesammelten Filtrate wurden im Vakuum bei 50°C auf 1 bis 2 ml Flüssigkeit eingengt, diese in 5 ml Methanol p.a. aufgenommen, in ein 10 ml Meßkölbchen filtriert und noch zweimal mit je 2 ml Methanol p.a. nachgespült. Diese Lösung wurde mit Methanol p.a. auf genau 10 ml aufgefüllt:

"Probe-Extrakt".

b) DC-Trennung:

Vom "Probe-Extrakt" werden mit einer Blutzuckerpipette zweimal drei verschiedene Konzentrationen (0,1 ml; 0,15 ml; 0,2 ml) strichförmig (2-3 cm) auf Kieselgel-60-F 254-Fertigplatten (Merck) aufgetragen und in dem Laufmittel Aceton:Chloroform:Wasser (8 : 2 : 0,5) entwickelt. Eine Bahn wird für den Blindwert freigelassen.

Detektion:

UV-254 nm, Fluoreszenzminderung

Folgende Zonen werden nach Trocknung der Platten unter dem UV-Licht 254 nm markiert.

Gentiopikrosid: Rf ca. 0,4
Amarogentin: Rf ca. 0,67
Amaropandin: Rf ca. 0,73

Aus dem Chromatogramm ist zu entnehmen, welche Droge vorliegt und ob nur Amarogentin oder Amarogentin und Amaropandin zu bestimmen sind.

8.4.2 Bestimmung von Amarogentin und Amaropandin

8.4.2.1 Vorbereitung:

Die Markierung der Bitterstoffzonen erfolgt in Form eines Rechteckes, das die ganze fluoreszenzmindernde Fläche und zusätzlich einen neutralen Rand von 1 mm um diese Zone mit-erfaßt. Eine etwa gleichgroße substanzfreie Fläche wird als Blindprobe markiert. Amarogentin und Amaropandin werden getrennt behandelt.

Die Kieselgelschicht wird vorsichtig abgeschabt und in ein 10 ml-Schliffzentrifugierröhrchen gegeben. Dazu gibt man 2,0 ml (Vollpipette) Methanol p.a. Jedes Röhrchen wird mit 2 Glaskugeln zweimal 30 Sek. am Whirli-Mix gerührt, 5 Minuten zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Aus dieser Lösung wird genau 1,5 ml für die Analyse entnommen und in ein graduiertes 10 ml-Schliff Röhrchen gegeben. Diese Lösung wird mit 0,5 ml Methanol p.a. auf 2,0 ml aufgefüllt: "Analysenlösung".

In dieser "Analysenlösung" sind $\frac{3}{4}$ der ursprünglich aufgetragenen Menge "Probe-Extrakt" enthalten. Das Ergebnis der Messung muß daher mit $\frac{4}{3}$ multipliziert werden, um die ursprünglich chromatographierte Menge zu erhalten.

8.4.2.2 Gehaltsbestimmung mit diazotierter Sulfanilsäure: (78)

a) Reagenzien

- 1 %ige Sulfanilsäurelösung in 2 mol. Salzsäure
- 5 %ige Lösung von Natriumnitrit in Wasser

20 %ige Lösung von Natrium-Carbonat in Wasser

b) Durchführung

2,0 ml "Analysenlösung" werden mit 0,2 ml 1 %ige Sulfanilsäurelösung versetzt und kurz geschüttelt, danach setzt man 0,2 ml 5 %ige Nitrit-Lösung zu, schüttelt noch einmal gut durch und läßt 15 Min. bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend füllt man die Röhrchen mit dest. Wasser auf 4,0 ml auf, schüttelt die Lösung und setzt 0,6 ml 20 %ige Na-carbonat-Lösung zu. Danach wird vorsichtig geschüttelt (Achtung CO_2 -Entwicklung). Anschließend wird mit Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt. Es muß nun kräftig geschüttelt werden, bis die CO_2 -Entwicklung aufhört, damit die photometrische Bestimmung nicht gestört wird. Innerhalb von 20 Min. ist die Extinktion der Lösung bei 470 nm am Zeiss-Spektralphotometer gegen eine gleichbehandelte Blindlösung zu messen. ($E : 0,13 \hat{=} 20 \text{ mg Amarogentin}$).

c) Eichgerade von 2,4-Dihydroxybenzoesäure (B-2,4)

4 - 5 mg aus Äthanol frisch umkristallisierte 2,4-Dihydroxybenzoesäure der Firma Merck, Reinheitsgrad 98 %, Schmelzpunkt $\sim 200^\circ\text{C}$ (unter Zersetzung) werden auf der Mikrowaage genau abgewogen und in 100,0 ml Methanol p.a. gelöst.

Dieser Lösung werden für eine Bestimmungsreihe 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 ml entnommen, in graduierte Schliff-röhrchen gegeben und auf 2,0 ml mit Methanol p.a. aufgefüllt.

Diese Lösung wird wie die "Analysenlösung" weiterbehandelt. Die Extinktionen werden bei 470 nm gemessen.

d) Auswertung der Ergebnisse

Die nach b) ermittelten Extinktionen für Amarogentin und Amaropanin müssen zunächst mit $4/3$ multipliziert werden. Aus den erhaltenen Werten wird die durchschnittliche Extinktion für 0,1 ml "Probe-Extrakt" für jeden der beiden

Bitterstoffe errechnet (E_{AG} und E_{AP}).

Die μg Bitterstoff, die diesen korrigierten Extinktionen entsprechen, können auf verschiedene Weise ermittelt werden.

- 1) Über die Eichgeraden der Bitterstoffreinsubstanzen (vgl. S. 63) können direkt die μg Bitterstoff abgelesen werden. 7 % irreversible Adsorption an Kieselgel müssen vom Endwert abgezogen werden, wenn die Eichgerade nicht bereits darauf eingestellt ist.
- 2) Über die molaren Eichgeraden (vgl. S. 68), die mit B-2,4 zu ermitteln sind, kann man aus den Extinktionen E_{AG} und E_{AP} die μmol Bitterstoff entnehmen.
- 3) Mittels einer gleichbehandelten Testlösung, die entweder aus Bitterstoffreinsubstanzen oder aus der Bezugssubstanz B-2,4 bestehen kann, ist aus dem Verhältnis der gefundenen Extinktionen der Probelösung und der Testlösung der Gehalt an Bitterstoffen nach folgenden Formeln zu errechnen:

Formel 1: Bitterstoffreinsubstanz als Test

$$G = \frac{E_P}{E_T} \cdot M_{(T)}$$

Formel 2: Bezugssubstanz B-2,4 als Test

$$G = \frac{E_P}{E_T} \cdot M_{(T)} \cdot K$$

G = μg Bitterstoff, die gesucht sind

E_P = gefundene Extinktion der Bitterstoffe in der Probelösung

E_T = gefundene Extinktion für die Testlösung

M = eingesetzte Menge (μg) Testsubstanz

K = Konstante, die für Formel 2 benötigt wird und für Amarogentin 2,62 und für Amaroparin 3,7 beträgt. (s. Seite 71).

8.4.3 Bestimmung des Gentiopikrosids mit der Anthron-Methode (75)

Reagenzlösung: 0,2 %ige Lösung von Anthron in 96 %iger Schwefelsäure.
(Die Lösung ist im Eisschrank nicht länger als 24 Stunden haltbar).

Vom "Probe-Extrakt" werden je zweimal 0,02 und 0,03 ml für die DC-Trennung entnommen. (Im Falle einer sehr hohen Gentiopikrosidkonzentration muß der "Probe-Extrakt" entsprechend verdünnt werden).

Die Durchführung der Chromatographie und die Markierung der Zonen erfolgt wie für Amarogentin beschrieben (Seite 104).

Die Gentiopikrosid-Zonen werden vorsichtig abgeschabt und in ein 10 ml-Schliffzentrifugierröhrchen gegeben. Für die Blindprobe entnimmt man der Platte eine ebenso große, substanzfreie Kieselgelfläche. Als Elutionsmittel werden 1,0 ml Methanol p.a. und 1,0 ml Wasser zugesetzt, und mit 2 Glaskugeln dreimal je 2 Min. am Whirli-Mixer geschüttelt.

Unter Eiskühlung wird in jedes Röhrchen 5,0 ml Anthron-reagenz pipettiert, vorsichtig geschüttelt und anschließend 4 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Die Lösungen werden danach gekühlt und das Kieselgel abzentrifugiert.

Die Extinktion der überstehenden Lösung wird gegen eine gleichbehandelte Blindlösung bei 620 nm im Zeiss-Spektralphotometer gemessen.

Als Bezugssubstanz bzw. zur Aufstellung einer Eichgerade wird wasserfreie Glucose (Firma Merck) verwendet.

Die Auswertung erfolgt entweder über die Glucose-Eichgerade oder Glucose wird als Bezugssubstanz mitbestimmt und man errechnet den Gehalt an Gentiopikrosid aus dem Verhältnis

der Extinktionen nach folgender Formel:

$$G = \frac{E_{GP}}{E_{Glu}} \cdot M_{Glu} \cdot K$$

G = gesuchte μ g Gentiopikrosid

M = eingesetzte μ g Glucose

E_{GP} = gefundene Extinktion für Gentiopikrosid aus der Probenlösung

E_{Glu} = gefundene Extinktion für Glucose-Testlösung

K = Konstante, die 1,98 beträgt und das Verhältnis der Molekulargewichte wiedergibt. (Siehe Seite 73)

8.4.4 Organoleptische Bitterwertsbestimmung (nach ÖAB 9)

Zur Eichung der Versuchspersonen wurde vorerst eine Bestimmung der Chinin-Standardlösung mit dem festgelegten Bitterwert von 200 000 nach DAB 7 BRD durchgeführt, und damit der persönliche Korrekturfaktor K bestimmt.

Dazu werden 0,1 g Chininhydrochlorid in 100 ml Wasser gelöst, 1,00 ml davon werden auf 100 ml verdünnt. Die so entstandene Stammlösung hat eine Verdünnung von 1 : 100 000.

Mit dieser Lösung wird beginnend mit 4,2 ml in Abstufungen von je 0,2 ml bis 5,8 ml eine Verdünnungsreihe hergestellt und mit Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt. Die eben noch bittere Lösung wird organoleptisch bestimmt. Der Korrekturfaktor K errechnet sich aus der Formel:

$$K = \frac{5,00}{a}$$

a = ml Stammlösung in der als bitter empfundenen Verdünnung.

Für die Bitterwertsbestimmung der Enzian-Extrakte wurden die für die quantitative, chemische Analyse bereiteten Methanol-Extrakte verwendet. Sie wurden mit Trinkwasser 1 : 10 verdünnt und dienten als Stammlösung für die sensorische Bitterwertsbestimmung nach ÖAB 9.

In einer groben Reihe wurde die Stammlösung in Stufen von

jeweils 1 : 10 verdünnt: 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 etc.

Aus der eben noch bitteren Lösung (A) wurde dann eine feine Verdünnungsreihe hergestellt und geprüft. Zur Vereinfachung wurde zuerst die Verdünnung 1 : 2 gekostet (5 ml Lösung A + 5 ml Wasser). Ist diese Verdünnung schon bitter, werden folgende Verdünnungen geprüft: 4,5 ml, 4,0 ml, 3,5 ml, 3,0 ml, 2,5 ml, 2,0 ml, 1,5 ml, die mit Wasser jeweils auf 10 ml aufgefüllt wurden.

Ist die 1 : 2-Verdünnung nicht bitter, muß die folgende Reihe geprüft werden: 5,5 ml, 6,0 ml, 6,5 ml, 7,0 ml, 7,5 ml, 8,0 ml, 8,5 ml, 9,0 ml, 9,5 ml, auch mit Wasser auf 10 ml verdünnt.

In einer Reihe beginnt man immer mit der Lösung, die am stärksten verdünnt ist.

Die Verdünnung, die eben noch bitter ist, wird bestimmt. Diese Verdünnung muß mit dem Korrekturfaktor K multipliziert werden.

Daraus läßt sich der Bitterwert der Stammlösung und damit der Bitterwert der Wurzel bezogen auf 1 g Droge berechnen.

Zu beachten ist, daß immer gleiche Volumina der auf Zimmertemperatur gebrachten Lösungen für 30 Sek. zu kosten sind. Eine Minute danach ist noch auf Nachwirkung zu achten.

Die nächste Probe ist erst nach 15 Min. zu kosten.

Die Bitterwirkung von Amarogentin ist sofort zu schmecken. Gentiopikrosid schmeckt man nach kurzer Latenzzeit. Hier ist besonders auf die Nachwirkung zu achten.

Der Bitterwert von Amaropanin und Amaroswerin ist auf die oben beschriebene Weise zu bestimmen. Auch hier ist die Bitterwirkung sofort zu empfinden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) A. KROMEYER, Arch. Pharm. 110, 27 (1862)
- 2) H. BOURQUELOT u. L. HÉRISSEY, J. Chim.pharm (6) 12, 421 (1900)
- 3) G. TANRET, Bull. Soc. chim. France (3) 33, 1059 (1905)
- 4) Y. ASAHINA , J. ASANO u. Y. WENO, Ber. dtsh.chem.Ges. 69, 771 (1936)
- 5) F. KORTE, Chem.Ber. 87, 512 (1954)
- 6) L. CANNONICA, F. PELLIZONI, P. MANITTO u. G. JOMMI, Tetrahedron 16, 192 (1961)
- 7) H. INOUE, T. YOSHIDA, Y. NAKAMURA u. Sh. TOBITA, Tetrahedron letters, 42, 4429 (1968)
- 8) T. KUBOTA u. Y. TOMITA, Tetrahedr. letters 5, 176 (1961)
- 9) H. INOUE, S. UEDA u. Y. NAKAMURA Tetrahedr. letters 43, 5229 (1966)
- 10) F. KORTE, Chem. Ber. 88, 704 (1955)
- 11) F. KORTE u. H.G. SCHICKE, Chem. Ber. 89, 2404 (1956)
- 12) H. INOUE u. Y. NAKAMURA, Tetrahedr. letters 47, 4919 (1968)
- 13) H. INOUE u. Y. NAKAMURA, Tetrahedron 27, 1951 (1971)
- 14) H. WAGNER u. L. HÖRHAMMER, Pharmakognosie and Phytochemistry (Springer Verlag), (1971) H. INOUE, S. 291
- 15) C.J. COSCIA, R. GUARNACCIA u. L. BOTTA, Biochemistry (8) 12, 5036 (1969)
- 16) S. BRECHBÜHLER-BADER, C.J. COSCIA, P. LOEW, C. v. SZCZEPANSKI u. D. ARIGONI, Chem. Commun. (1968), 136
- 17) C.J. COSCIA u. R. GUARNACCIA, Chem. Commun. (1968) 138
- 18) R. GUARNACCIA u. C.J. COSCIA, L. BOTTA, J.Am. Chem. Soc. 91 (1) 204 (1969)
- 19) D. GRÖGER u. P. SIMCHEN, Z. Naturforschg. 24 b, 356 (1969)
- 20) H. INOUE, Tetrahedr. letters 33, 3221 (1967)
- 21) H. INOUE, Sh. UEDA u. Y. TAKEDA, Tetrahedr. letters 30, 3453 (1968)
- 22) H. INOUE, S. UEDA, K. INOUE u. Y. TAKEDA, Chem. Pharm. Bull. 22, (3) 676 (1974)

- 23) H. INOUE, S. UEDA u. Y. NAKAMURA, Chem. Pharm. Bull. 18 (10), 2043 (1970)
- 24) H. INOUE, S. UEDA u. Y. TAKEDA, Chem. Pharm. Bull. 19, 587 (1971)
- 25) H. INOUE, S. UEDA u. Y. Nakamura, Chem. Pharm. Bull. 18 (9), 1856 (1970)
- 26) A.R. BATTERSBY, R.S. KAPIL, J.A. MARTIN u. L.MO, Chem. Commun. (1968) 133
- 27) P. LOEW u. D. ARIGONI, Chem. Commun. (1968) 137
- 28) R. GUARNICCIA u. L. BOTTA, J.Am.Chem. Soc. 92, (20), 6098 (1970)
- 29) F. KORTE, Z. Naturforschg. 9 b, 354 (1954)
- 30) H. INOUE, T. YOSHIDA, Y. NAKAMURA u. S. TOBITA, Chem. Pharm. Bull. 18 (9), 1889 (1970)
- 31) S. POPOV u. N.L. MAREKOV, Phytochemistry 10 (12), 3077 (1971)
- 32) S. POPOV u. N.L. MAREKOV, Chem. & Ind. (1971) 655
- 33) H. INOUE, S. UEDA, Y. NAKAMURA, K. INOUE, T. HAYANO u. H. MATSUMURA, Tetrahedron 30, 571 (1974)
- 34) E. STEINEGGER u. Th. WEIBEL, Pharm. Acta. Helv. 26, 259 (1951)
- 35) T. KUBOTA u. Y. TOMITA, Tetrahedr. letters 14, 453 (1961)
- 36) T. KUBOTA u. T. KAMIKOWA, Bull.Soc. Chem. Japan. 35, 1046 (1962)
- 37) A.M. VERNEY u. A.M. DEBELMAS, Anal.pharm. franc. 31, (6), 415 (1973)
- 38) K. HOSTETTMANN, Helv.chim. acta 57 (1), 204 (1974)
- 39) G. BELLMANN u. A. JACOT-GUILLARMOD, Helv. chim. acta 56 (18), 284 (1973)
- 40) W. SCHMID, Planta med. Supplement (1966)
- 41) H. REIN u. M. SCHNEIDER, Einführung in die Physiologie des Menschen 12. Auflage (1956) S. 235 ff., Berlin-Göttingen-Heidelberg
- 42) M.P. THEIN u. B. SHOFIELD, Journ. Physiolog. (London) 148, 291 (1958)
- 43) J. POHL, Naunyn Schmiedeberg's Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 25, 21 (1889)
- 44) J. IVANCEVIĆ u. Z. SUSTERSIC, Ronas Ber.ges.Physiol. u. exp. Pharmakol. 132, 571 (1943)

- 45) K. JUNKMANN, Naunyn Schmiedeberg's Arch.f.exp.Path. u. Pharm. 143, 368 (1929)
- 46) P. WEGER, Naunyn Schmiedeberg's Arch.f.exp.Path. u. Pharm. 144, 261 (1929)
- 47) J.E. ROMBOUITS u. J. LINKS, J.Experientia 12 (2), 78 (1955)
- 48) G. MADAUS, Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Abtlg.I, Georg Thieme Verlag Leipzig (1938), S. 1438
- 49) R. HÄNSEL, Planta med. Supplement (1966)
- 50) W.A. SEXTON, Chemische Konstitution und biologische Wirkung, Verlag Chemie (1958)
- 51) S. GHOSAL, P.V. SHARMA u. R.K. CHAUDHURI, J. of Pharm. Sciences 63, (8) 1286, (1974)
- 52) L. PEYRON, Les stimuli amers
- 53) R.S. SCHALLENBERGER u. T.E. ACREE, Nature 216, 480 (1967)
- 54) T. KUBOTA u. I. KUBO, Nature 223, 97 (1969)
- 55) E. PFEIL, Chemie für Labor und Betrieb 1, 17 (1973)
- 56) R.S. SCHALLENBERGER, J. Food Sci. 28, 584 (1963)
- 57) T.R. DASTOL u. S. PRICE, Science 154, 905 (1966)
- 58) L. ROSENTHALER, Apoth. Ztg. 44, 744 (1929)
- 59) K.R. MARKHAM, Tetrahedron 20, 991 (1964)
- 60) M. LUCKNER, O. BESSLER u. P. SCHRÖDER, Pharmazie 20, 16 (1965)
- 61) E. STAHL, Chromatographische und mikroskopische Analyse von Drogen, Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart (1970) S.93
- 62) O. LUDERITZ u. O. WESTPHAL, Z. Naturforschg. 7 b, 548 (1952)
- 63) K. WALLENFELS, Naturwissenschaften 37, 491 (1950)
- 64) D. GRÖGER u. P. SIMCHEN, Pharmazie, 22, 315 (1967)
- 65) G.A. LUGG, Analyt. Chem. 35, (7) 899 (1963)
- 66) H. JATZKEWITZ u. U. LENZ, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 305, 53 (1956)
- 67) R. NEU, Microchim. acta (1957) 196
- 68) E.E. MORSE u. R. DREYWOOD, Analyt. Chem. 19, 1012 (1947)
- 69) K. WEINGES, P. KLOSS u. W.D. HENKELS, Liebigs Ann.Chem. (1973) 566

- 70) S. GHOSAL, R.K. CHAUDHURI, M.P. TIWARI u. A.K. SINGH
Tetrahedr. letters 5, 403 (1974)
- 71) H. INOUE u. Y. NAKAMURA, Yaku Gaku Zasshi 91 (7), 755
(1971)
- 72) R. FISCHER, F. GRIFFIN u. B. PASAMANICK, Psychopathologie of Perception, Paul Hock and Jos. Zubin Edit., Grune & Statton, New York, London (1965) S. 129
- 73) G. JELLINEK, Planta med. Supplement (1966)
- 74) R. KÄMPF, Schweizer Apoth. Ztg. 111, 195 (1973)
- 75) H. HELD, Dissertation München (1964)
- 76) S. HESTRIN, J. biol. Chemistry 180, 249 (1949)
- 77) T. FURUYA, J.Chromatog. 18 (1), 152 (1965)
- 78) Z.J. VEJDELEK, Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organ. Verbindungen, Band I, S. 495
- 79) J. VACEK u. L. TYROLOVA, Pharmaz. Zentralhalle Deutschland 97, 514 (1958)
- 80) J. VACEK u. L. TYROLOVA, Ceskoslov. Farmac. 7, 497 (1964)
- 81) H.G. BRAY, V.W. THRPE u. K. WHITE, Biochem. J. 46, 271
(1950)
- 82) S.M. PATRIDGE, Nature (London) 164, 443 (1949)
- 83) S. HAKOMORI, J. Biochem. 55, 205 (1964)

LEBENS LAUF

Am 21. 5. 1946 wurde ich, Keyvandokht Münzing-Vasirian, geb. Vasirian, als einziges Kind von Dr. jur. Huschang Vasirian, Offizier der Iranischen Kaiserlichen Armee, und seiner Gemahlin Mahrokh, geb. Rahnemoun, in Teheran/Iran geboren.

1952/53 begann ich die Schulzeit in Paris, wo mein Vater promovierte, und setzte sie später in Teheran fort. 1953 verlor ich meinen Vater. Danach kam ich mit meiner Mutter wieder nach Europa. Nach öfterem Schulwechsel, bedingt durch Reisen in Deutschland und Österreich, legte ich schließlich im Mai 1965 die Reifeprüfung an der Bundesrealschule Wien IV ab.

Im Wintersemester 1965/66 begann ich an der Wiener Universität Pharmazie zu studieren. Ich beendete dieses Studium am 1. 2. 1971 mit der Graduierung zum Magister der Pharmazie.

Nach kurzer Einarbeitungszeit im März/April 1971, begann ich am 9. 12. 1971 am Institut für pharmazeutische Arzneimittel-lehre der Universität München unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner mit der vorliegenden Arbeit.

Von 1966 - 71 bekam ich ein Stipendium der Pahlevi-Foundation, Iran. Seit 1. 1. 1973 bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle der Universität München beschäftigt.

Am 26. 5. 1974 heiratete ich den Apotheker, Dr. rer. nat. Heinz-Peter Münzing.

